

Funktionelle Rolle von Oberflächenladungen in der *Turret*-Domäne des viralen Miniatur- Kaliumkanals Kcv



Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades
eines *Doctor rerum naturalium*
genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Hans Henrik
von Rosenberg Lipinsky**
aus Neheim-Hüsten

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel
Mitberichterstatter: PD Dr. Adam Bertl

Tag der Abgabe: 1. September 2006
Tag der mündlichen Prüfung: 3. November 2006

Darmstadt 2006

D17

**Das Gleiche lässt uns in Ruhe,
aber der Widerspruch ist es,
der uns produktiv macht.**

J.W.von Goethe

Abbildung Titelseite: Homologiemodell des viralen Kaliumkanals Kcv. Mit freundlicher Genehmigung von Dipl.-Biol. Sascha Tayefeh und PD Dr. Stefan M. Kast (TU Darmstadt, Physikalische Chemie I).

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Allgemein: Kaliumkanäle	1
1.2	Struktur von Kaliumkanälen	2
1.3	Auswirkungen von Oberflächenladungen	7
1.3.1	Die Gouy-Chapman-Theorie	7
1.3.2	Modellierung eines Kaliumkanals durch Brownsche Dynamik	9
1.4	Der Miniatur-Kaliumkanal Kcv	13
1.4.1	Kcv: Struktur-Funktionsanalysen	14
1.5	Zielsetzung	16
2.	<u>Material und Methoden</u>	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Enzyme	17
2.3	Größenstandards	17
2.4	Reaktionssysteme (Kits)	17
2.5	Oligonukleotide	18
2.6	Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten	18
2.7	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren	19
2.7.1	Vektor pSGEM	19
2.7.2	Plasmidpräparationen	20
2.7.3	Quantifizierung der Plasmid-DNA und der cRNA	20
2.7.4	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	20
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.7.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
2.7.7	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.7.8	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.7.9	DNA-Sequenzierung	23
2.8	Verfahren mit Ribonukleinsäuren	23
2.8.1	Synthese von cRNA (<i>In vitro</i> -Transkription)	23
2.8.2	Elektrophoretische Auftrennung von cRNA Fragmenten	24
2.9	Das Heterologe Expressionssystem der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	25
2.9.1	Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	25
2.9.2	Beschreibung von <i>Xenopus</i> Oozyten	26
2.9.3	Präparation und Entnahme der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	26
2.9.4	Enzymatische Entfernung des Follikelepithels	27
2.9.5	Injektion von cRNA	27
2.9.6	Benötigte Lösungen	28
2.10	Elektrophysiologie (<i>voltage clamp</i>)	29
2.10.1	Das Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (<i>Two-electrode voltage clamp</i> , <i>TEVC</i>)	29

2.10.2	Der Messaufbau	30
2.10.3	Elektroden und Pipetten	31
2.10.4	Benötigte Lösungen	31
2.11	Datenauswertung	32
2.12	Internetadressen und GenBank Nummern	32
3.	<u>Ergebnisse</u>	33
3.1	Heterologe Expression von Kcv in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	33
3.2	Zielgerichtete Mutationen an geladenen Aminosäuren im extrazellulären Teil von Kcv-wt	41
3.2.1	Vergleich zwischen Kcv-wt und den Mutanten K46A, K47A und der Doppelmutante K46A/K47A	48
3.2.2	Vergleich zwischen Kcv-wt und den Mutanten K46R und K47R	58
3.2.3	Vergleich zwischen Kcv-wt und der Mutante D45N	63
3.2.4	Vergleich zwischen Kcv und der Mutante D45E	67
3.2.5	Vergleich zwischen Kcv und der Mutante D68N	69
3.2.6	Zeitkonstanten der auf zeitliche Aktivierung untersuchten Mutanten	73
3.2.7	Verschiebung der Aktivierungskurven	75
4.	<u>Diskussion</u>	79
4.1	Mutationen von extrazellulären Ladungen führen zu einer Änderung in der Kinetik und in der Spannungsabhängigkeit von Kcv	82
4.2	D68N bildet einen Ring aus negativen Ladungen um die externe Kanalpore	87
5.	<u>Theoretische Analyse der Elektrostatik und der Kalium- bzw. Chloriddichte von PBCV-1-Kcv und dessen Mutanten anhand von Homologie-Modellen</u>	90
6.	<u>Zusammenfassung</u>	97
7.	<u>Literaturverzeichnis</u>	99
	Anhang	108
	A Abkürzungen	108
	B Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode	109
	C Umkehrspannungen	110
	D Mutagenese primer	111
	Eidesstattliche Erklärung	116
	<u>Lebenslauf</u>	117
	<u>Danksagung</u>	118

1. Einleitung

1.1 Allgemein: Kaliumkanäle

Ionenkanäle und speziell Kaliumkanäle existieren vermutlich in allen Lebensformen und sind an grundlegenden Zellfunktionen wie der Osmoregulation, an Wachstumsprozessen, der Ausbildung eines Membranpotentials und an der Signaltransduktion beteiligt (Hille, 2001). In biologischen Prozessen wie der Steuerung des sensorischen Systems, Verhalten oder Wahrnehmung spielen elektrische Signale eine grundlegende Rolle (Kandel *et al.*, 2000). Diese Signale werden unter anderem mittels Ionenflüssen durch Membranproteine vermittelt. Diese Proteine werden auch als Ionenkanäle bezeichnet und sind essentiell für die Erzeugung und Weiterleitung von elektrischen Signalen. Eine hohe Diversität von Ionenkanälen, die unterschiedliche Ionen selektiv leiten, ist bekannt und charakterisiert (Hille, 2001). Ungeachtet des Kanaltyps ist der Prozess der Permeation, also Erleichterung der Passage des Ions durch einen Kanal und somit der Membran, die zentrale Eigenschaft eines Ionenkanals. Der hydrophobe Kern einer Lipid-Doppelschicht repräsentiert eine hohe energetische Barriere für die Ionen Passage ($\sim 50 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Parsegian, 1969). Interaktionen der Kanalkomponenten und der zu leitenden Ionen senken diese Energiebarriere erheblich ($\sim 2\text{-}3 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Berneche und Roux, 2001). Diese reduzierte Energiebarriere korrespondiert ungefähr mit einer veränderten Permeationszeit von $\sim 10^{16}$ Jahren zu $\sim 10 \text{ ns}$ pro Ion (Chatelain *et al.*, 2005). Durch die reduzierte Energiebarriere können Ionen nahe am Diffusionslimit über eine Membran transportiert werden. Wie Kanäle die transmembrane Energiebarriere umgestalten, um die Ionen Passage zu erleichtern, bleibt eine fundamentale Frage, deren Verständnis die Funktion und Struktur von Ionenkanälen und die Interaktion mit Kanalinhhibitoren oder Effektoren aufklären könnte.

Kaliumkanäle bilden eine prominente Gruppe unter den Ionenkanälen und sind von großem Interesse. Dies liegt an zwei bemerkenswerten Eigenschaften: Einerseits eine sehr hohe Leitfähigkeit ($\sim 10^8 \text{ Ionen s}^{-1}$) und andererseits an der hohen Substrat-Selektivität (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001). Kalium wird je nach Kaliumkanaltyp gegenüber Natrium zwischen 10:1 und 10000:1 bevorzugt. Diese außergewöhnliche Eigenschaft ist umso erstaunlicher, da Kaliumionen größer als Natriumionen sind (Ionenradius von 1,33 Å gegenüber 0,95 Å) (Hille, 2001). Würde nur der Porenradius von Bedeutung sein, so sollte jede Pore, die Kalium leitet, auch Natrium leiten können.

1.2 Struktur von Kaliumkanälen

Ein funktioneller Kaliumkanal wird von vier Untereinheiten gebildet (Liman *et al.*, 1992), wobei Homo- und Hetero-Tetramere gefunden wurden. Die Untereinheiten sind symmetrisch um die wassergefüllte Pore angeordnet (MacKinnon *et al.*, 2001). Alle Kaliumkanäle haben einen gemeinsamen strukturellen Kern: „Das Porenmodul“. Das Porenmodul setzt sich pro Untereinheit aus zwei Transmembranhelices (TM) und dem Poren-Loop (P) zusammen. Innerhalb des Poren-Loops liegen die Porenhelix und eine hoch konservierte Aminosäuresequenz (TXXXGY/FG), die als „signature sequence“ bezeichnet wird (Heginbotham *et al.*, 1994). Diese Sequenz bildet den Selektivitätsfilter, der für die hohe Selektivität von Kaliumkanälen verantwortlich ist (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Anhand der Abbildung 1.1 des bakteriellen Kaliumkanals KcsA (*Streptomyces lividans*) sollen die verschiedenen Domänen des Porenmoduls vorgestellt werden. Dargestellt ist die Seitenansicht von zwei Untereinheiten des Kanals. Die cytoplasmatische Domäne am C-terminalen Ende ist nicht abgebildet. Mit M1 und M2 sind die beiden Transmembranhelices bezeichnet zwischen denen sich der Poren-Loop befindet. Der Poren-Loop besteht aus dem Selektivitätsfilter (F) und der Porenhelix (P). Die extrazellulär gelegene *Turret*-Domäne (T), eine schlaufenähnliche Struktur, verbindet die erste Transmembranhelix mit dem Poren-Loop. Der Poren-Loop und die *Turret*-Domäne bilden zusammen die strukturellen Eigenschaften der Poren-Region aus. Unterhalb der Poren-Region befindet sich eine Kavität (C), die die Verbindung zum cytoplasmatischen *Gate* (G) herstellt.

Die Struktur, die den Selektivitätsfilter bildet, besteht weitgehend aus den Carbonylgruppen des Rückgrats der Aminosäuresequenz des Selektivitätsfilters „TXGYG“. Die geometrische Anordnung des Selektivitätsfilters bildet die chemische Struktur der inneren Hydrathülle um das Kaliumion nach und bietet zusammen mit lokalen elektrostatischen Eigenschaften eine bevorzugte Umgebung für Kaliumionen (Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

Die Signatursequenz findet man in allen bisher klonierten Kaliumkanälen sowohl aus Eukaryoten, Prokaryoten als auch aus bestimmten Viren. Im einfachsten Fall besteht ein Kaliumkanal nur aus dem Porenmodul und gegebenenfalls aus einer cytoplasmatischen Domäne. Eine solche Architektur findet sich beispielsweise bei den eukaryotischen Kir-Kanälen (*inward rectifier*) und den bakteriellen Kaliumkanälen KcsA aus *Streptomyces lividans* (Abb. 1.1) und KirBac1.1 aus *Burkholderia pseudomallei*.

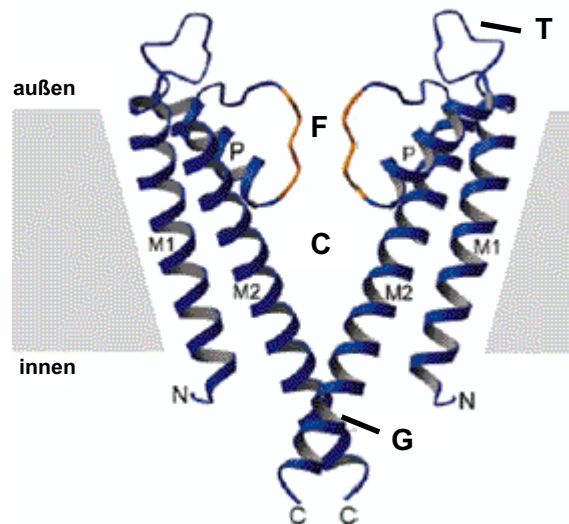


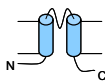
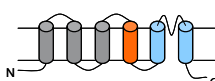
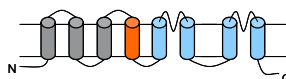
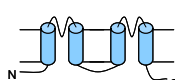

Abb. 1.1: Struktur des bakteriellen Kaliumkanals KcsA

Zwei von vier Proteinuntereinheiten sind in der Seitenansicht gezeigt. Zwischen den transmembranen Helices (M1 und M2) befinden sich die verschiedenen Domänen der Poren-Region. Die wichtigen funktionellen Bereiche des Kaliumkanals sind von außen nach innen: die *Turret*-Domäne (T), die Porenhelix (P), die Filterregion (F), die Kavität (*cavity*, C), und das Tor (*Gate*, G) (nach Jiang *et al.*, 2002a).

Weit verbreitet sind die Kv-Kanäle (*voltage gated*) mit vier zusätzlichen Transmembrandomänen (6TM-Motiv) (Tab. 1.1). Bei diesem Kanalmotiv befindet sich der Poren-Loop zwischen den Transmembranhelices 5 und 6. Zu diesem Strukturtyp gehören z.B. die tierischen Kanäle der *Shaker*-Gen Familie, die *Ether-à-Gogo* (EAG) Kanäle (Kubo *et al.*, 1992) und die ersten Kanäle die in Pflanzen identifiziert wurden. Dies waren die beiden Kaliumkanäle aus *Arabidopsis thaliana*, AKT1 (*Arabidopsis K⁺ Transporter 1*) und KAT1 (*Kalium Arabidopsis thaliana channel 1*). Neben dem Poren-Loop besitzen die Kaliumkanäle vom 6TM-Motiv eine weitere markante Funktionseinheit, den Spannungssensor (S4-Helix). Die S4-Helix trägt mehrere positiv geladene Aminosäuren (Arg und Lys) und spielt somit eine Rolle in der Spannungsabhängigkeit des Ionentransports (Liman *et al.*, 1991). Die Änderung des Membranpotentials führt zu einer Bewegung dieses Proteinabschnitts und dadurch zum Öffnen oder Schließen der Pore.

Eine weitere Unterfamilie bilden die so genannten Tandem-Kanäle (Tab. 1.1) mit zwei Porendomänen. Im Cetk1.3-Kanal (*Caenorhabditis elegans*) ist das 2TM-Motiv verdoppelt (Goldstein *et al.*, 1996). Bei Tok1 (*Saccharomyces cerevisiae*) ist ein 6TM-Motiv mit einem 2TM-Motiv verknüpft (Ketchum *et al.*, 1995). Kaliumkanäle werden, je nach der Anzahl ihrer transmembranen Helices je Untereinheit, in unterschiedliche Familien eingeteilt (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Übersicht der Strukturtypen und Kanalfamilien

Kaliumkanal	Beispiel	Organismus	
2TM-Typ			
			
Kir (inward rectifier)	KirBac1.1 Kir6.2	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Homo sapiens</i>	
Kanalhomologe aus Prokaryoten	KcsA MthK	<i>Streptomyces lividans</i> <i>M. thermoautotrophicum</i>	
Kanalhomologe aus Algenviren	Kcv Kesv	<i>Chlorellavirus PBCV-1</i> <i>Ectocarpusvirus EsV-1</i>	
6TM-Typ			
			
Kv (Shaker-Typ)	Shaker (Kv1)	<i>Drosophila melanogaster</i>	
EAG (ether-à-gogo)	EAG hERG	<i>Caenorhabditis elegans</i> <i>H. sapiens</i>	
Slo (BK-Kanäle)	mSlo	<i>H. sapiens</i>	
HCN (Hyperpolarisations-aktivierte, Cyclo-Nucleotid-gesteuerte Kanäle)	HCN2	<i>H. sapiens</i>	
pflanzliche K ⁺ -Kanäle	KAT1 AKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>A. thaliana</i>	
Tandem-Kanäle			
6TM-Motiv + 2TM-Motiv		Tok1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2x 2TM-Motiv		Cetk1	<i>C. elegans</i>
Virale Ionenkanäle			
Beispiel			
(1TM)		M2 Vpu	Influenza Virus A HIV-1

Mit KcsA ist es erstmalig gelungen, ein Kaliumkanalprotein zu kristallisieren (Doyle *et al.*, 1998). Die Röntgenstrukturanalyse dieses einfach gebauten Kanals mit zwei Transmembrandomänen (Abb. 1.1) hat viel dazu beigetragen, die Kaliumselektivität auf molekularer Basis zu verstehen. Es folgten weitere Röntgenstrukturanalysen, wie die der bakteriellen Kaliumkanälen KirBac1.1 aus *Burkholderia pseudomallei* (Kuo *et al.*, 2003), MthK aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Jiang *et al.*, 2002b), K_vAP aus *Aeropyrum pernix* (Jiang *et al.*, 2003) und den Shaker-Kanal aus *Rattus norvegicus* (Long *et al.*, 2005).

Analysen der Kristallstrukturen lieferten Einblicke in den als *Gating* bezeichneten Mechanismus, der für das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle verantwortlich ist (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002a, 2002b, 2003b; Kuo *et al.*, 2003). Eine elementare Frage, die mit dem *Gating* von Kaliumkanälen verknüpft ist, ist die nach der Lage der beteiligten Strukturen und der damit einhergehenden Konformationsänderungen, die das reversible Öffnen und Schließen gewährleisten. Einen Hinweis auf diese Frage bietet ein Vergleich der in unterschiedlichen Zuständen vorliegenden Kristallstrukturen. Wahrscheinlich ist eine umfassende Torsion, z.B. eine Gegenrotation, für das Kanal-*Gating* verantwortlich. Bei dieser Konformationsänderung ist vor allem das putative intrazelluläre Gate beteiligt. Aber auch die extrazelluläre *Turret*-Domäne scheint eine Rolle beim Kanal-*Gating* zu spielen (Shrivastava und Bahar, 2006).

Die *Turret*-Domäne verbindet die erste Transmembranhelix des Poren-Moduls mit der Porenhelix. Ein Vergleich zwischen den *Turret*-Domänen der fünf als Kristallstruktur vorliegenden Kaliumkanäle zeigt, dass die *Turret*-Domäne keine starre Struktur darstellt, sondern durchaus dynamisch am *Gating*-Prozess beteiligt sein kann (Shrivastava und Bahar, 2006). In welchem Ausmaß die *Turret*-Domäne das *Gating* beeinflusst, werden zukünftige Arbeiten zeigen. Die Sequenzen der fünf als Kristallstruktur vorliegenden Kaliumkanäle weisen alle geladene Aminosäuren in der *Turret*-Domäne auf (Abb. 1.2). Allerdings weist KirBac 1.1 nur die konservierte negative Ladung am Übergang der ersten Transmembranhelix und der *Turret*-Domäne auf.

Innerhalb der verschiedenen Kaliumkanal-Klassen ist die *Turret*-Domäne in ihrer Komposition variabel und unterschiedlich lang. Ein *Alignment* von 116 kaliumselektiven Kanälen aus den acht Kaliumkanal-Hauptgruppen (Shealy *et al.*, 2003) zeigt, dass eine hohe Variation in der Länge der *Turret*-Domäne zwischen den verschiedenen Klassen besteht, wobei ein Minimum von 3 Aminosäuren (2 Poren-Tandem-Kanal aus einer Hefe-Art) und ein Maximum von 54 (EAG-Kanal vom Rind; *Bos taurus*) Aminosäuren gefunden wurde. Innerhalb der einzelnen Klassen ist die Länge viel weniger variabel. Dies führt zu der Vermutung, dass die *Turret*-Domäne zu spezifischen Funktionen innerhalb der jeweiligen Klasse beiträgt (Shealy

et al., 2003). Hierbei weisen alle Kanäle zwischen 2-17 geladene Aminosäuren innerhalb der *Turret*-Domäne auf, wobei die längste *Turret*-Domäne auch am meisten Ladungen beinhaltet. Nur sechs Kanäle tragen rein negative Ladung und ein Kanal nur ein positiv geladenes Histidin (2 Poren-Tandem-Kanal aus einer Hefe-Art). Alle übrigen weisen mindestens eine negative und eine positive Ladung in der *Turret*-Domäne auf.

Das heißt, die *Turret*-Domäne könnte bezüglich ihrer Länge und Ladungsdichte in jeder Klasse eine spezifische Funktion ausüben, die die Eigenschaften der Poren-Region beeinflusst.

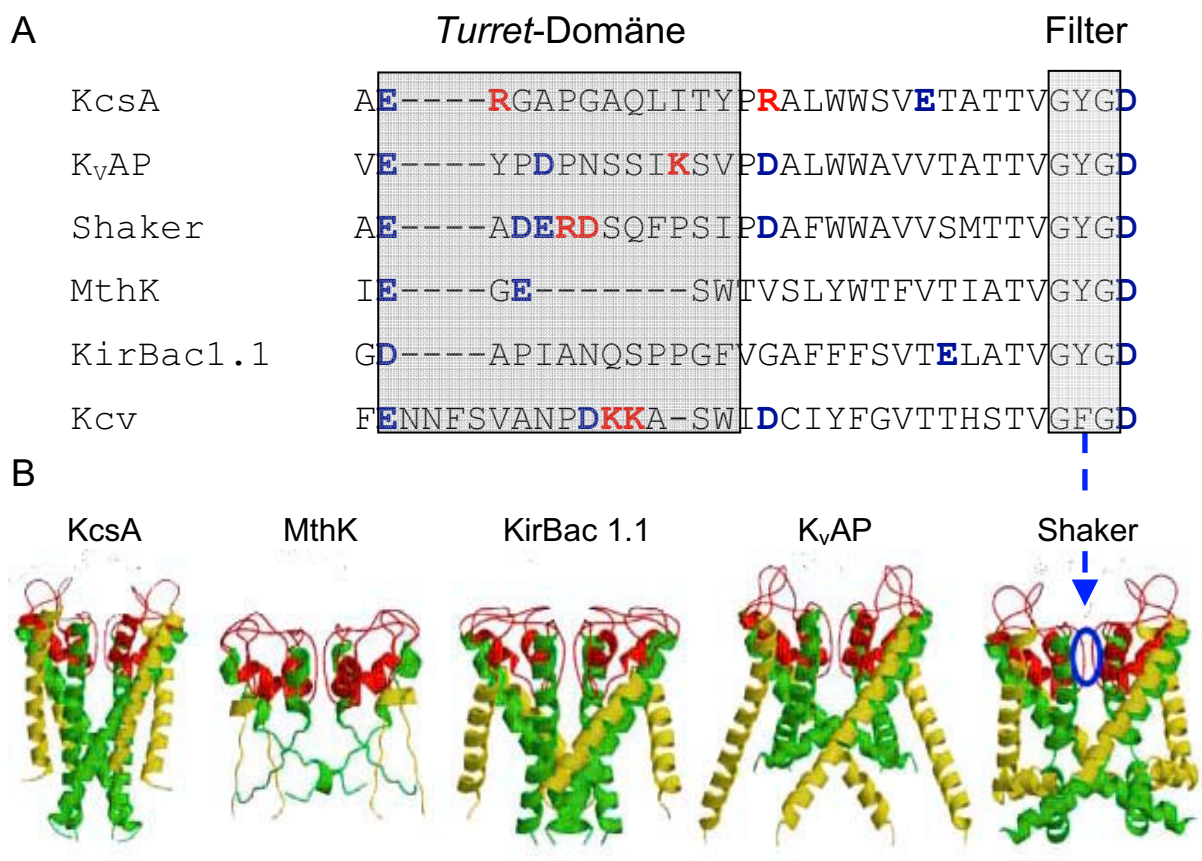


Abb. 1.2: Sequenz der *Turret*-Domäne und Struktur des Porenmoduls der fünf als Kristallstrukturen vorliegenden Kaliumkanäle und des Untersuchungsobjekts Kcv

(A) Alignment der *Turret*-Domäne und der Filter-Sequenz. Die Sequenz zeigt, dass alle dargestellten Kaliumkanäle innerhalb der *Turret*-Domäne, also an der Grenze zur wässrigen Phase, geladene Aminosäuren vorweisen. Das Untersuchungsobjekt Kcv wird in Abschnitt 1.4 vorgestellt (B) Struktureller Vergleich des Poren-Moduls der fünf als Kristallstruktur vorliegenden Kaliumkanäle. Alle Strukturen sind als Tetramer abgebildet. Die erste Transmembranhelix ist gelb und die zweite grün gefärbt. KcsA, MthK und KirBac1.1 gehören zu den 2TM Kanälen; KvAP und Shaker zu den 6TM-Kanälen, wobei nur die Poren formenden Helices dargestellt sind. Die Poren-Region mit der Porenhelix, dem Selektivitätsfilter und der *Turret*-Domäne ist rot gefärbt (Abbildung der Kanäle aus Shrivastava und Bahar, 2006).

1.3 Auswirkungen von Oberflächenladungen

Die *Turret*-Domäne befindet sich wie in Abbildung 1.1 und 1.2 (B) dargestellt auf der extrazellulären Seite der Kaliumkanäle innerhalb der Poren-Region. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die schlaufenähnliche Struktur auf der Oberfläche des Proteins und an der Grenze zur wässrigen Phase exponiert liegt. Dieser Umstand lässt die Vermutung zu, dass die im *Turret* befindlichen geladenen Aminosäuren als Oberflächenladung wirken. Die Gouy-Chapman Theorie und ein mit Brownscher Dynamik erstelltes Modell von KcsA können die möglichen Auswirkungen von geladenen Aminosäuren in diesem Bereich erklären.

1.3.1 Die Gouy-Chapman-Theorie

Die Gouy-Chapman Theorie (McLaughlin, 1989; Hille, 2001) beschreibt die Auswirkung von stationären, gleichmäßig verteilten Oberflächenladungen auf das Membranpotential. Eine negative Oberflächenladung bewirkt die Ausbildung einer auf die Membran aufgelagerten Doppelschicht, bestehend aus den negativen Oberflächenladungen und den in Lösung befindlichen Kationen. Der Einfachheit halber, werden nur die externen Oberflächenladungen betrachtet, da in den meisten Experimenten nur ein externer Lösungsaustausch erfolgt.

Die mathematische Beschreibung der Gouy-Chapman-Theorie ist bei Ehrenstein (2001) nachzulesen. Hier soll eine qualitativ physikalische Betrachtung erfolgen: In Abwesenheit von jeglicher Oberflächenladung ergibt sich das Ruhepotential über der Membran aus der Konzentration und der Membran-Permeabilität der verschiedenen Ionenspezies. Wenn eine externe negative Oberflächenladung hinzugefügt wird, bildet sich auf der Membran eine Ladungs-Doppelschicht aus (Ehrenstein, 2001). Dadurch wird ein elektrisches Feld innerhalb der Membran geschaffen, das sich zum Ruhepotential der Membran addiert. Die grundlegende Idee ist, dass lokale elektrische Felder, die durch Ladungen nahe der Membran-Lösungs-Grenze entstehen, die Wahrnehmung der Spannungssensoren in der Membran so beeinflussen, dass eine systematische Abweichung in der Spannungssensorik hervorgerufen wird (Abb. 1.3) (Hille, 2001).

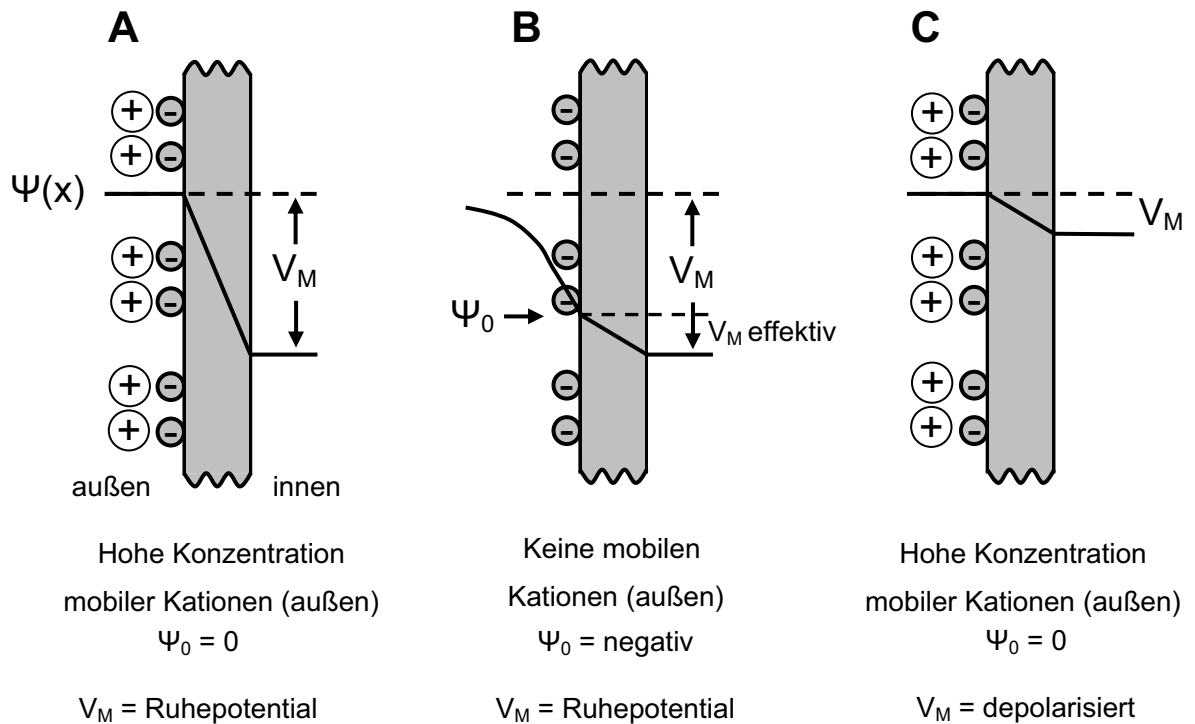


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Gouy-Chapman-Theorie.

Elektrisches Feld $\Psi(x)$ nahe einer Membran mit fixierten negativen Ladungen auf der Oberfläche. Die Stärke des elektrischen Feldes innerhalb der Membran ist proportional der Steigung von $\Psi(x)$. Das Membranpotential ist als Differenz zwischen der Außen- und Innen-Lösung definiert. Die Zeichnung zeigt nur die fixierten Oberflächenladungen und die komplexierten Kationen. Nicht dargestellt sind die Ionen der Außen- und Innen-Lösung, eine lokale Ionenatmosphäre der nicht neutralisierten Oberflächenladungen in (B) und die externen und internen Ionen, die die Membran kapazitiv aufladen. (A) Sind alle negativen Oberflächeladungen abgeschirmt, ergibt sich das elektrische Feld innerhalb der Membran aus dem Ruhepotential. (B) Ohne mobile Kationen ergibt sich eine negative Nettoladung auf der Oberfläche. Daraus entsteht ein lokales negatives Potential und daher ein geändertes elektrisches Feld über die Membran. Ein Spannungssensor in der Membran spürt eine Potentialänderung wie bei einer Depolarisation (C). (C) Bedingungen sind wie in (A), nur die Membran ist depolarisiert (nach Hille, 2001).

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der lokalen Ladungsdichte in und um spannungsabhängige Ionenkanäle. Nachdem die spannungsabhängigen Eigenschaften des Kanals bestimmt wurden, erfolgt eine Neutralisation einer Oberflächenladung und damit eine Änderung des lokalen elektrischen Feldes. Hierbei wird eine Veränderung der spannungsabhängigen Eigenschaften, wie der Leitfähigkeit, der Aktivierung und von Zeitkonstanten erwartet.

Durch die Änderungen im elektrischen Feld werden die spannungsabhängigen Eigenschaften entlang der Spannungsachse verschoben. Solche spannungsabhängigen Eigenschaften können beispielsweise die Parameter eines Boltzmann-Fits, wie die halbmaximale Aktivierungsspannung (x_0) oder der reziproke Steigungsfaktor ($d\lambda$) sein. Hierbei korrespondiert das Ausmaß der Verschiebung mit der Größenordnung der neutralisierten Ladung. Herkömmliche Methoden der Neutralisation sind zielgerichtete Mutationen oder Abschirmung von nega-

tiven Ladungen durch meist polyvalente Kationen (Ehrenstein, 2001; Hille, 2001).

Dass die Spannungsabhängigkeit eines Kanals durch Oberflächenladungen beeinflusst wird, stimmt mit experimentellen Befunden überein. Beispiele hierfür sind ein Natrium-Kanal aus dem Skelettmuskel eines Frosches (Hahnin und Campbell, 1983) und ein Kalium-Kanal aus dem Tintenfisch Riesenaxon (Gilbert und Ehrenstein, 1969). Hierbei wurde bei Neutralisation einer negativen Ladung durch divalente Kationen eine Verschiebung der spannungsabhängigen Eigenschaften in depolarisierender und bei Erhöhung der negativen Ladung auf der Membranoberfläche eine Verschiebung in hyperpolarisierender Richtung beobachtet. Viele weitere konsistente Befunde für die Oberflächenladungs-Theorie konnten gefunden werden und sind in Ehrenstein (2001) zusammengefasst. Allerdings wurden auch von inkonsistenten Verschiebungen entlang der Spannungsachse berichtet (Gilly und Armstrong, 1982). Andere Kritikpunkte an der Gouy-Chapman-Theorie sind: (a) Die Ladungen sind nicht gleichmäßig über die Membran verteilt; (b) nicht alle untersuchten Kanäle werden in gleicher Weise beeinflusst; (c) die Änderungen im *Gating* können meistens nicht durch eine reine Verschiebung auf der Spannungsachse erklärt werden (Hille, 2001).

1.3.2 Modellierung eines Kaliumkanals durch Brownsche Dynamik

Die geladenen Aminosäuren im *Turret* könnten auch Teil eines Dipols sein, der die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Ionen in der Pore beeinflusst.

Die Bestimmung der Kristallstruktur von KcsA und der folgenden Verfeinerung der Auflösung auf 2.0-Å haben wertvolle Aufschlüsse über die Funktion von Kaliumkanälen gegeben (Doyle *et al.*, 1998; Morais-Cabral *et al.*, 2001). Innerhalb der Gruppe der Kaliumkanäle existieren große Unterschiede in Bezug auf Leitfähigkeit und *Gating*-Eigenschaften. Trotz dieser Unterschiede haben sie die hohe Selektivität für Kalium Ionen gemeinsam (Hille, 2001). Es ist wahrscheinlich, dass die Diversität innerhalb der Kaliumkanäle von strukturellen Änderungen in der Protein-Architektur ausgeht. Nützliche Einblicke in die Protein-Architektur, können Vorhersagen der relevanten Kanalstrukturen auf der Basis ihrer funktionellen Eigenschaften bieten (Chung *et al.*, 2002). Diese Vorhersagen beruhen unter anderem auf elektrostatischen Berechnungen. Einen vereinfachten Einblick in die Ergebnisse dieser Berechnungen auf der Basis von KcsA sollen die folgenden Abbildungen bieten (Abb. 1.4-1.6 von S.H. Chung).

In Abbildung 1.4 ist ein modellierter Kaliumkanal zu sehen, ohne die Einbeziehung von relevanten Oberflächenladungen bzw. intramolekular positionierten Ladungen. Wenn ein in Wasser gelöstes Ion sich einer niedrigen dielektrischen Grenze, wie einem Protein, nähert, so erfährt es eine elektrostatische Abstoßung. Die Abstoßung erfolgt aufgrund von induzierten Ladungen auf der Oberfläche. Ein in den Kanal eintretendes Ion erfährt also eine Abstoßung und sieht sich mit einer Energiebarriere konfrontiert. Ein Kalium Ion, dass entlang der zentralen Achse durch den Kanal durchtreten möchte, begegnet einer unüberwindbaren Energiebarriere. Der Kanal ist impermeabel für Ionen (Abb. 1.4).

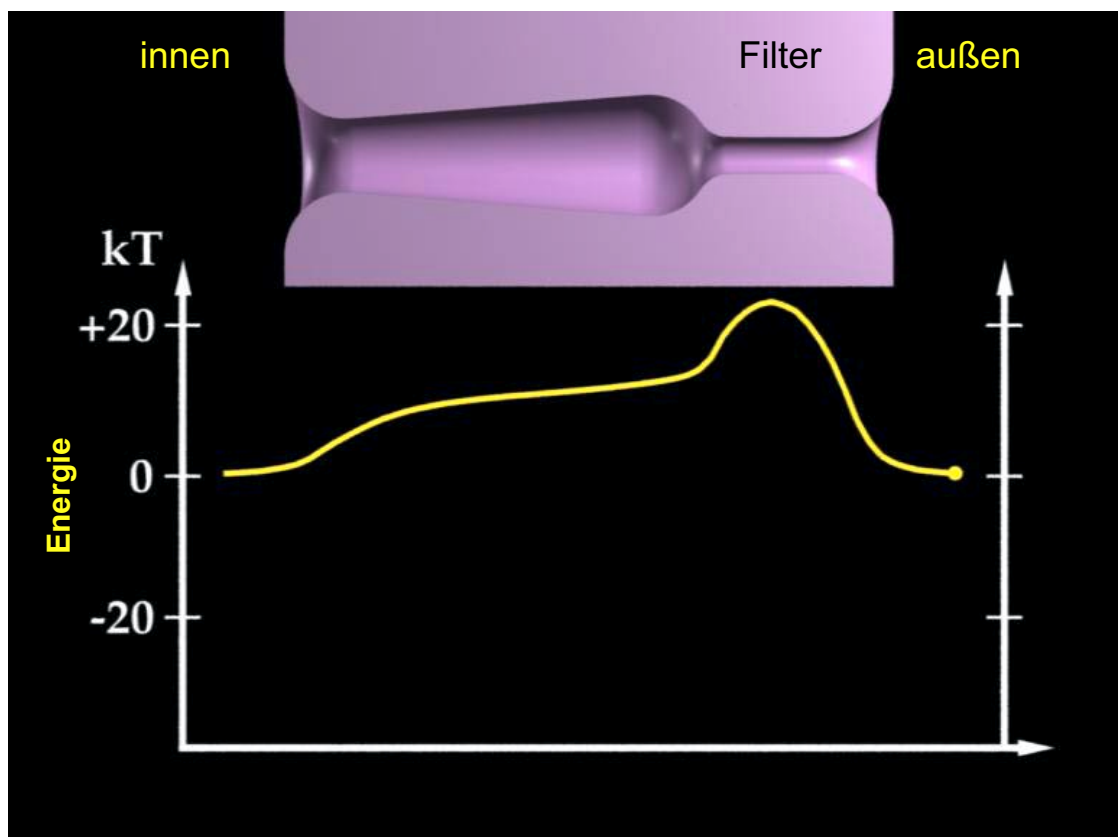


Abb. 1.4: Elektrostatische Berechnungen eines auf KcsA-Daten basierenden Kaliumkanals

Im oberen Teil der Abbildung ist ein Modell eines Kaliumkanals zu sehen. Das Energieprofil zeigt die abstoßende Kraft, die ein Ion entlang der Kanalachse vorfindet. Die gezeigte elektrostatische Berechnung wurde ohne die Einbeziehung von relevanten Oberflächenladungen bzw. intramolekular positionierten Ladungen durchgeführt. Das in Wasser gelöste Ion erfährt eine elektrostatische Abstoßung und der Kanal ist für Ionen impermeabel. (1 kT = 0,592 kcal/mol).

Erst wenn geladene Aminosäuren bzw. Dipole dem Modell hinzugefügt werden, wird der Kanal permeabel für Ionen. Im Fall von KcsA kleiden 16 Carbonylgruppen, die jeweils eine Partialladung tragen, den Selektivitätsfilter aus. Vier Porenhelix-Dipole, sind mit ihren negativen Polen auf die Kavität gerichtet. Abschließend werden noch um den inneren und äußeren Poreneingang Dipolringe eingeführt. Diese drei Gruppen von Dipolen transformieren die von einem Ion erfahrene Energiebarriere entlang der Kanalachse in eine Energiesenke (Abb.1.5).

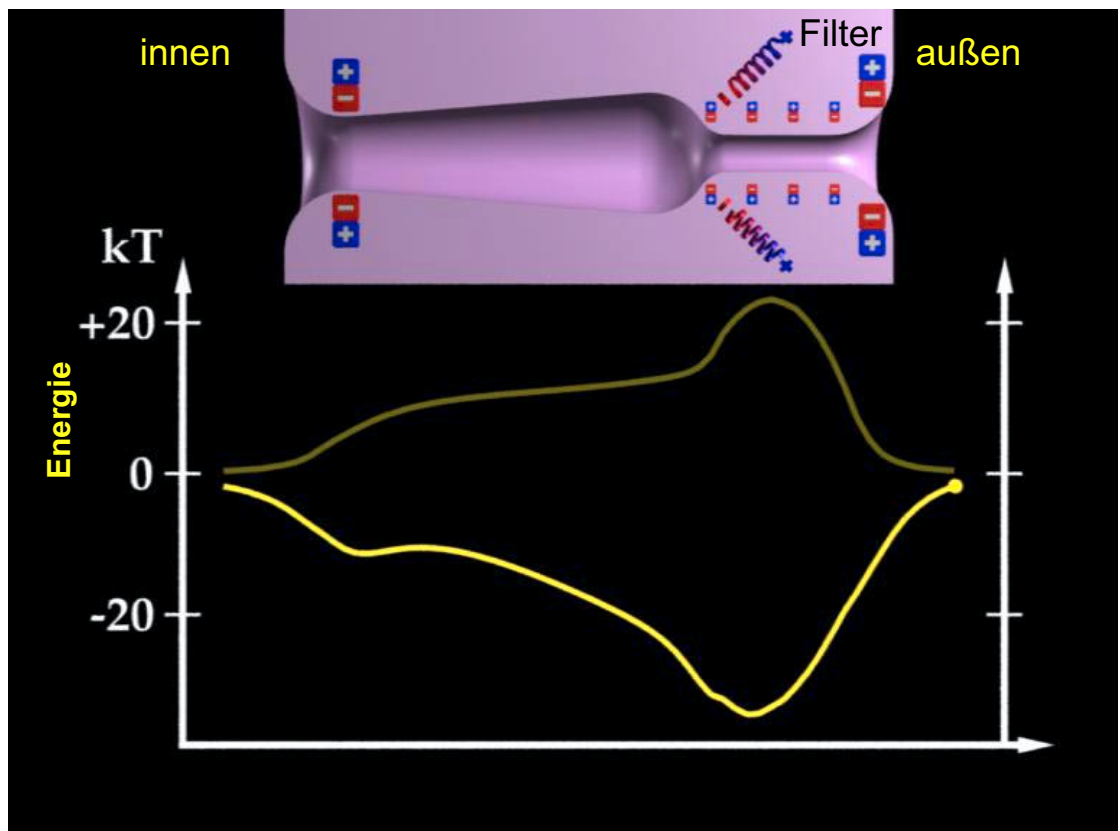


Abb. 1.5: Elektrostatistische Berechnungen eines auf KcsA-Daten basierenden Kaliumkanals

Im oberen Teil der Abbildung ist ein Modell eines Kaliumkanals zu sehen. Das Energieprofil zeigt mit Einbeziehung der relevanten Oberflächenladungen bzw. intramolekular positionierten Ladungen (Dipole), dass die unüberwindbare Energiebarriere in eine Energiesenke umgewandelt wird. Der Kanal ist jetzt für Ionen permeabel. (1 kT = 0,592 kcal/mol).

Sobald ein Ion in den Kanal hineingezogen wird und die Position des Energieminimums besetzt, verändert sich das Energieprofil erneut. Das zweite in den Kanal eindringende Ion besetzt demzufolge ein anderes Energieminimum und verändert dadurch wiederum das Energieprofil des ersten Ions (Abb. 1.6). Das Energieprofil eines dritten Ions ist wiederum verändert. Hat das dritte Ion ausreichend kinetische Energie und nähert sich dem Selektivitätsfilter, wirken abstoßende Coulombkräfte, die das stabile Equilibrium stören und das erste Ion aus dem Filter drängen: Der Kanal leitet. Dies ist ein dynamischer Prozess, indem jedes Ion Einfluss auf das Energieprofil hat. Daher ist die richtige Abstimmung der Dipole bzw. Ladungen für die Gleichrichtung eines Kanals von hoher Wichtigkeit (Chung et al., 2002; Internetauftritt von Chung: http://anusf.anu.edu.au/Vizlab/viz_showcase/shinho_chung/index.html).

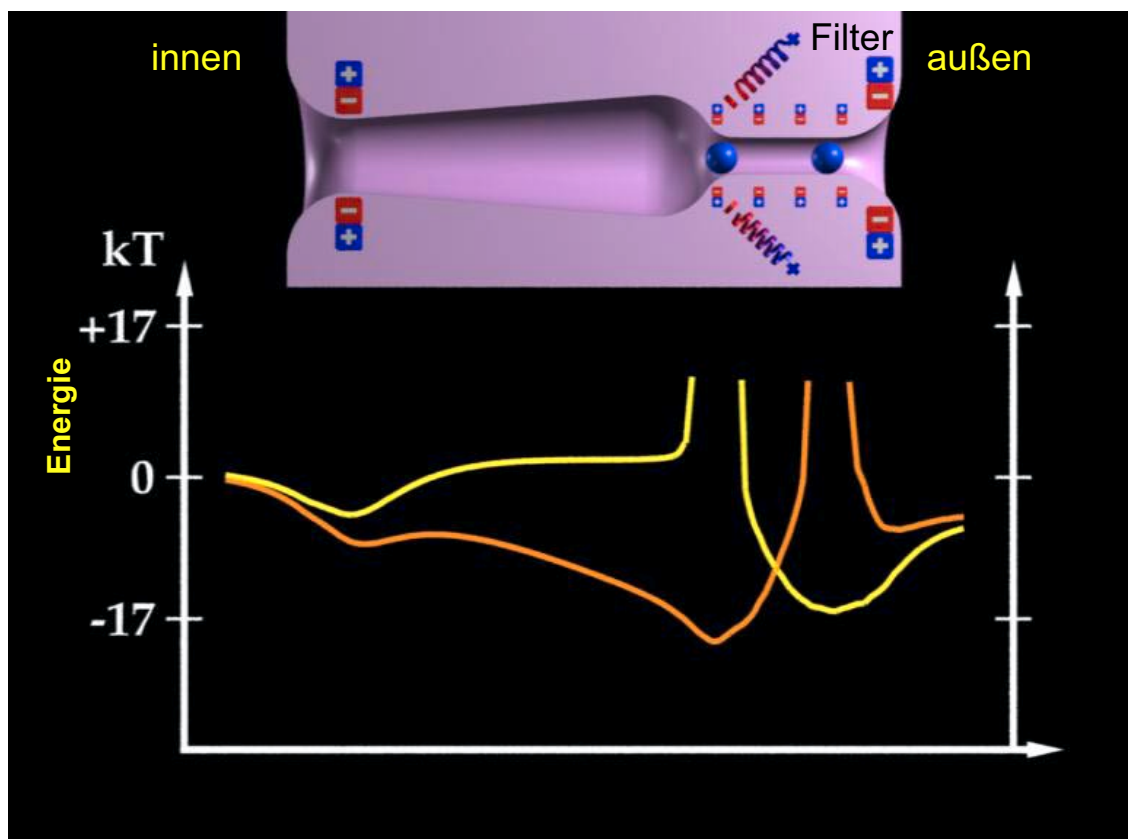


Abb. 1.6: Elektrostatistische Berechnungen eines auf KcsA-Daten basierenden Kaliumkanals

Im oberen Teil der Abbildung ist ein Modell eines Kaliumkanals zu sehen. Das Energieprofil ändert sich mit dem zweiten Ion, das in den Selektivitätsfilter eindringt. Das erste Ion (rechts) ist mit einem anderen Energieprofil (gelb) konfrontiert als das zweite Ion (orange). (1 kT = 0,592 kcal/mol).

1.4 Der Miniatur-Kaliumkanal Kcv

Der *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* (PBCV-1) war der erste Virus, in dem ein funktioneller Kaliumkanal gefunden wurde (Plugge *et al.*, 2000). PBCV-1 gehört zur Familie der *Phycodnaviridae* und besitzt ein eikosaedrisches Capsid, eine interne Lipidmembran und ein großes doppelsträngiges DNA-Genom (330 kbp) (Van Etten *et al.*, 2002). Die Familie der *Phycodnaviridae* ist weltweit verbreitet. Die bevorzugten Wirte sind eukaryotische Algen verschiedener Ordnung. Der Wirt von PBCV-1 ist die *Chlorella*-ähnliche Grünalge NC-64A, die als Endosymbiont des Pantoffeltierchens *Paramecium bursaria* vorkommt.

Der Kaliumkanal Kcv scheint für die Replikation des *Chlorella Virus* essentiell zu sein. Dies ergaben Studien mit Kaliumkanalinhibitoren, bei denen die Replikation des Virus im *Plaques*-Test in gleicher Weise gehemmt wurde wie die Aktivität von heterolog in *Xenopus* Oozyten exprimierten Kcv-Kanälen (Plugge *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen verdeutlichten, dass Kcv im Viruspartikel lokalisiert ist und eine essentielle Funktion während der ersten Minuten der Infektion spielt (Mehmel *et al.*, 2003; Frohns *et al.*, 2006).

Weitere viruscodierte Ionentransportproteine wurden in Influenzaviren (Pinto *et al.*, 1992) und dem Aidsvirus HIV-1 gefunden (Piller *et al.*, 1996). Jedoch zeigt keines der Proteine eine Sequenzähnlichkeit mit zellulären Transportproteinen. Das M2-Protein aus dem humanpathogenen Influenza A Virus bildet als Tetramer einen Protonenkanal aus (Pinto *et al.*, 1992); das Vpu-Protein aus dem HI Virus-1 bildet einen Kationenkanal (Ewart *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 1996). Solche Proteine, die den Durchtritt von Ionen und kleineren Molekülen über die Membran vermitteln, nennt man Viroporine (Carrasco, 1995). Viroporine wurden bisher in neun Virenfamilien beschrieben (Gonzales und Carrasco, 2003), die genaue physiologische Funktion bleibt in den meisten Fällen jedoch bislang ungeklärt.

Der Miniatur-Kaliumkanal aus dem *Chlorella Virus* (Kcv) besteht nur aus 94 Aminosäuren und ist damit einer der kleinsten seiner Art, trotzdem weist er alle Merkmale eines eukaryotischen Kaliumkanals auf (Plugge *et al.*, 2000). Die *signature sequence* liegt innerhalb eines Poren-Loops, bestehend aus Turret-Domäne, Porenhelix und Selektivitätsfilter. Eingefasst wird der Poren-Loop von zwei transmembranen Helices und bildet so ein für Kaliumkanäle typisches Poren-Modul (siehe Abb. 1.1). Außerdem besitzt Kcv noch einen kurzen, wahrscheinlich helicalen cytoplasmatischen N-Terminus (12 Aminosäuren), mit drei geladenen Aminosäuren (K⁶, R¹⁰ und E¹²). Der C-Terminus ist Teil der zweiten Transmembranhelix, somit fehlt Kcv ein cytoplasmatischer C-Terminus.

Kcv lässt sich in verschiedenen heterologen Expressionssystemen funktionell exprimieren (Gazzarrini *et al.*, 2003) und erzeugt eine kaliumselektive Leitfähigkeit mit einer Steigung im Nernst-Plot von ca. 60 mV (Plugge *et al.*, 2000). Diese Leitfähigkeit zeigt eine gewisse

Spannungsabhängigkeit, wobei die Strom-Spannungs-Beziehung über ein breites Spannungsfenster linear verläuft und nur bei extremen Spannungen eine Reduktion des Stromes zeigt. Die leicht spannungsabhängige Leitfähigkeit von Kcv lässt sich durch Kaliumkanalhemmstoffe inhibieren. Die vorgestellten elektrophysiologischen Eigenschaften, die gute Expression in heterologen Systemen und die auf das Poren-Modul reduzierte Struktur prädestinieren Kcv als Modellkanal für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen bei Kaliumkanalproteinen (Gazzarrini *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2004; Hertel *et al.*, 2006).

1.4.1 Kcv: Struktur-Funktionsanalysen

Kcv teilt viele funktionelle Eigenschaften mit anderen komplexeren Kaliumkanälen (Plugge *et al.*, 2000) und lässt sich im Gegensatz zu den bakteriellen Kaliumkanälen leicht in heterologen Expressionssystemen untersuchen (Gazzarrini *et al.*, 2003). Homologie-Modellierung von Kcv auf der Basis der KirBac1.1 Kristallstruktur verdeutlichen, dass sich die geladenen Aminosäuren in der *Turret*-Domäne und der Porenhelix gegenseitig beeinflussen könnten. Außerdem zeigt sich in diesem Modell, dass sich direkt an den Selektivitätsfilter ein konservierter Aspartatrest anschließt. Im funktionellen Kanal bilden die vier Aspartatreste einen Ring aus negativen Ladungen um den extrazellulären Poreneingang.

Um die Wirkung von elektrostatischen Kräften auf die Funktion von Kaliumkanälen zu untersuchen, bietet sich demzufolge der Miniatur-Kaliumkanal aus dem *Paramecium bursaria Chlorella* Virus-1 (PBCV-1) an. Das Protein stellt den bisher kleinsten bekannten funktionellen Kaliumkanal dar und korrespondiert grundsätzlich mit dem Poren-Modul anderer Kaliumkanäle.

Die Untersuchung von Kcv ähnlichen Genen aus 40 weiteren *Chlorella* Viren Spezies ergab sechs Kcv ähnliche Proteine mit Änderungen in der Aminosäure-Sequenz in den meisten funktionellen Domänen des Kanals (Abb.1.A1) (Kang *et al.*, 2004). Sogar in der ansonsten hoch konservierten Porenregion war ein Aminosäureaustausch im Selektivitätsfilter (F66L) zu beobachten. Auffällig ist, dass im *Turret*, der schlaufenartigen Struktur zwischen der ersten Transmembranhelix und der Porenhelix, keine Mutation auftritt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die exakte Struktur dieser Domäne für die Funktion des Proteins essentiell ist. Auffällig in der Struktur des *Turrets* ist eine Anhäufung von drei geladenen Aminosäuren, die entsprechend von Homologiemodellen an der Oberfläche des Kcv-Kanals, also an der Grenze zur externen Lösung liegen.

		N Terminus		TM1		turret		
PBCV-1	1	MLVFSKFLTRTE		PFMIHLFILAMFVMIYKFFPGG		FENNFSVANPDKKASW		50
CA-4B	1	.	.	L	.	.	.	50
AL-2A	1	.	.	L	.	.	.	50
AN69A	1	.	.	VV	.	T	R	50
MA-1D	1	.	.	VV	.	T	R	50
NY-2A	1	.	MK	VV	.	T	R	50
NY-2B	1	.	.	VV	.	T	R	50

		Poren Helix		Filter		TM2		C Terminus
PBCV-1	51	IDCIYFGVTT		STVGFGD		GAKLCTIAHIVTVFFIVLTL		94
CA-4B	51	.	L	.	.	.	CV	94
AL-2A	51	.	L	.	.	.	CV	94
AN69A	51	.	L	.	.	.	M	94
MA-1D	51	.	L	94
NY-2A	51	.	L	.	.	TS	.	94
NY-2B	51	.	L	.	L	R	F	94

Abb. 1.7: *Alignment* der sechs ähnlichen Kcv Proteine aus verschiedenen Viren Spezies

Das *Alignment* verdeutlicht die geringe Diversität der Kcv Proteine. Jedes Protein ist nach einem Virus aus der repräsentativen Gruppe benannt. Im Vergleich zu PBCV-1 sind nur die Aminosäuresubstitutionen in den anderen Viren Spezies aufgeführt. Die Zuordnung der möglichen strukturellen Domänen basiert auf einem *Alignment* von PBCV-1 mit KcsA und ist grau hinterlegt. Innerhalb des *Turrets* konnte keine Mutation zwischen den verschiedenen Viren Spezies festgestellt werden. Auffällig in der Struktur des *Turrets* ist eine Anhäufung von drei geladenen Aminosäuren (DKK), die entsprechend von Homologiemodellen an der Oberfläche des Kcv-Kanals, also an der Grenze zur externen Lösung liegen.

1.5 Zielsetzung

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sind ein Beitrag zur Aufklärung von allgemeinen Struktur-Funktions-Zusammenhängen von Kaliumkanälen mit Hilfe des Miniatur-Modellproteins Kcv.

Die in allen funktionellen Kcv-Proteinen hoch konservierte *Turret*-Domäne mit drei aufeinander folgenden geladenen Aminosäuren, gibt Anlass zu der Vermutung, dass es sich um eine essentielle Struktur im Kcv-Protein handelt. Deshalb wurde der Focus in dieser Arbeit auf die Rolle der geladenen Aminosäuren und deren mögliche Interaktionspartner gelegt. Hierzu gehören ebenfalls geladene Aminosäuren in der Porenhelix und am Rand des Selektivitätsfilters. Durch zielgerichtete Punktmutationen wurden die entsprechenden Positionen mit neutralen oder geladenen Aminosäuren substituiert.

Mittels der elektrophysiologischen Standardmethode der Zwei-Elektroden Spannungsklemme wurden die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Kcv typischen Eigenschaften in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, über die Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden) und Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) bezogen.

2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen waren von New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot).

Für die PCR wurde die *Pfu* DNA-Polymerase, der entsprechende 10 x Polymerase-Puffer und dNTPs von Promega (Mannheim) verwendet.

2.3 Größenstandards

1 kb oder 100 kb DNA *Ladder* (NEB, Frankfurt a.M.)

1 kb RNA *Ladder, Low Range* (Fermentas, St. Leon-Rot)

2.4 Reaktionssysteme (Kits)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

HiSpeed™ Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

GenElute™ High Performance Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

MinElute™ Reaction Cleanup Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Riboprobe® Combination System-SP6/T7 RNA Polymerase (Promega, Mannheim)

RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega, Mannheim)

mMessage mMachine® T7 Kit (Ambion, Europe Ltd.)

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei der Verwendung von Reaktionssystemen stets die Angaben des Herstellers befolgt.

2.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma Genosys (Steinheim) und Biomers (Ulm) synthetisiert.

Die Sequenzen der einzelnen Primer sind im Anhang aufgelistet.

2.6 Sterilisation von Lösungen und Arbeitsgeräten

Lösungen, Nährmedien, Puffer, Einmalplastikmaterialien und Glasmaterial wurden 20 min in feuchter Hitze bei 1,5 bar/121 °C autoklaviert. Die Sterilisation von Glaspipetten erfolgte über 4-5 h bei 180 °C im Trockenschrank. Thermolabile Lösungen und Puffer wurden durch Sterilfiltration (0,2 µm Filter; Schleicher & Schuell) entkeimt.

Die für die Oozyten-Präparation und -Injektion benötigten Utensilien wurden bei 180 °C für 4 h ausgebacken. Hierzu gehörten die noch nicht gezogenen Injektionskapillaren, 50 ml Erlenmeyerkolben und das Operationsbesteck. Letzteres wurde auch regelmäßig im Ultraschallbad gereinigt.

2.7 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren

2.7.1 Vektor pSGEM

pSGEM ist ein modifizierter pGEMHE Expressionsvektor für *Xenopus* Oozyten, der freundlicherweise von M. Hollmann (Max Planck Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde.

Für das Konstrukt wurde der Vektor pGEMHE (Liman et al., 1992) um die multiple Klonierungsstelle von pBluescript erweitert. Grundlage des Konstruktes pGEMHE ist der Vektor pGEM-3Z (Promega, Mannheim), in den die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des β -Globingens aus *Xenopus laevis* eingefügt wurden.

pGEM-3Z:

- β -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz)
- lacZ-Gen (α -Komplementation für Blau-Weiß-Selektion)
- T7 RNA-Polymerase-Promotor
- Zugangsnummer: Genbank X65304

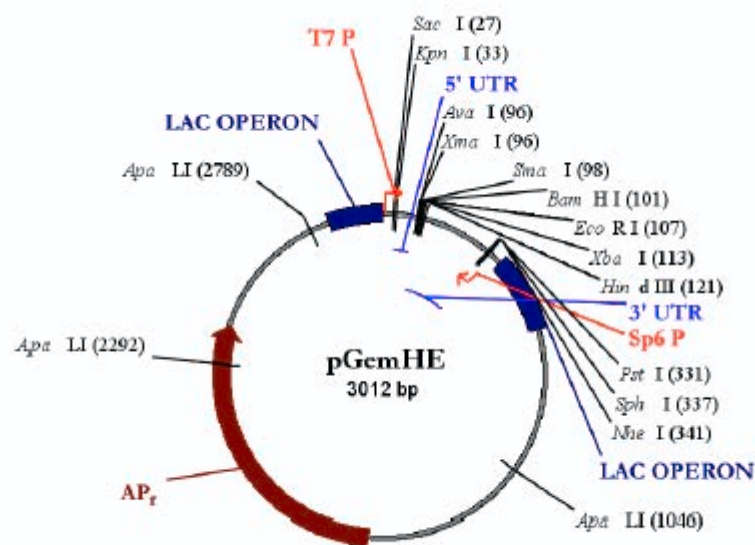


Abbildung 2.1: Aufbau des Vektors pGEMHE.

Vermerkt ist das Gen für die Ampicillin-Resistenz (AP_r) und das Lactose Operon (LAC OPERON). Die Polylinker-Region mit den zur Verfügung stehenden Restriktionsschnittstellen befindet sich stromaufwärts vom Startpunkt für die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase (T7 P) und wird von den untranslatierten Regionen (5' UTR und 3' UTR) des *Xenopus* β -Globulin-Gens flankiert.

2.7.2 Plasmidpräparationen

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde mit der alkalischen Lyse nach Sambrook *et al.* (1989) oder mit dem *GenElute*TM Plasmid Miniprep Kit von Sigma durchgeführt. Zur Elution der DNA wurden jedoch 50 µl H₂O_{bidest} (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers verwendet. Größere Mengen Plasmid-DNA mit hoher Reinheit wurden mit dem *HiSpeed*TM Plasmid Midi Kit von Qiagen oder dem *GenElute*TM *High Performance* Plasmid Midiprep Kit von Sigma gewonnen. Jedoch wurde die Plasmid-DNA mit H₂O_{bidest} (pH ca. 7) anstatt des mitgelieferten Puffers eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.7.3 Quantifizierung der Plasmid-DNA und der cRNA

Die Konzentrationen wässriger DNA- oder cRNA-Lösungen wurden spektralphotometrisch anhand der Absorption von Licht bei 260 nm bestimmt (Photometer GensysTM 5 / Spectronic, Leeds, UK bzw. NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Delaware, USA). Dabei wurde eine optische Dichte (OD₂₆₀) von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA gleichgesetzt. Um Proteinverunreinigungen zu registrieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Reinheit der Lösung wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt. Ein Verhältnis von unter 1,8 gilt als Maß für geringe Verunreinigung durch Proteine (Sambrook *et al.*, 1989)

2.7.4 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Charakterisierung von DNA diente deren gezielter Abbau mittels spezifisch spaltender Restriktionsenzyme. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den diesbezüglichen Vorschriften der Herstellerfirmen.

2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente in dieser Arbeit der qualitativen und quantitativen Analyse von DNA. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 0,8-1,2 µl Ethidiumbromid 1:10000 (w/v) versetzt. Als Trägermaterial wurde Agarose verwendet. In den meisten Fällen wurden 1 %ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA pH 8,0) eingesetzt. Die jeweiligen Proben wurden mit 5 x TAE-Probenpuffer (50 % Glycerin, 1 % Bromphenolblau) versetzt und in eine Geltasche gefüllt. Gelläufe erfolgten bei 100 V für ca. 60 min. Als Längenstandard wurde die 100 bp DNA-Leiter oder die 1 kbp DNA-Leiter (NEB, Frankfurt a.M.) verwendet.

2.7.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für die *site directed* Mutagenese eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit dem *Multi Cyclor PTC* (MJ Research, Watertown, MA, USA) durchgeführt.

2.7.6.1 Site directed Mutagenese

Für die Konstruktion der Kcv-Mutanten wurde das Protokoll des *QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) verwendet. In dieser PCR-basierten Methode diente das Konstrukt Kcv-pSGEM als *Template* und wurde über die im Anhang aufgelisteten Mutagenese-Primer amplifiziert.

Es wurde ein 50 µl-Ansatz mit 30-50 ng Templat-DNA, 40 pmol dNTP-Mix (10 pmol je dNTP), je 125 ng eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers, 5 µl 10 x Reaktions-Puffer und 3 U *Pfu*-DNA Polymerase eingesetzt.

PCR-Programm:

- 1 min 95 °C (Denaturierung der DNA)
- 16 Zyklen mit
 - 30 s bei 95 °C (Denaturierung der DNA)
 - 60 s bei 55 °C (Hybridisierung der Primer)
 - 7 min bei 68 °C (Elongation durch die Pfu-Polymerase)
- 10 min 68 °C (Auffüllen unvollständiger Amplifikate)
- ∞ 4 °C Stopp der Reaktion

Zum Verdau der methylierten, nicht mutierten *Template*-DNA wurden die PCR Produkte mit 10 U *Dpn* I für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitze-Schock Transformation von *E.coli*.

2.7.7 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

2.7.7.1 Hitze-Schock Transformation chemisch kompetenter Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen (*XLBlue1*) wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1985) hergestellt. Zur Transformation wurden 50 µl Zellsuspension mit 1-2 µl (50-500 ng) Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert, danach für 1 min bei 42 °C erwärmt und wieder für 2 min auf Eis gehalten. Die Antibiotikaresistenz wurde für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln in 250 µl SOC-Medium (20 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) in Abwesenheit von Antibiotika exprimiert. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurde eine Kolonie in 3 ml LB + Antibiotika über Nacht angezogen und diese Kultur in die Plasmid Präparation eingesetzt. Dieser Kulturen wurden ebenfalls für die Herstellung von Glycerindauerkulturen verwendet.

2.7.8 Kultivierung von *E.coli*

Die *E. coli*-Stämme *DH5-α* und *XLBlue1* wurden zur Klonierung von Plasmiden verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Medium nach Luria und Bertani (Bertani 1952).

LB-Medium: 5 g/l NaCl
 10 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

Für das Wachstum auf Agarplatten wurde das Flüssigmedium mit 15 g/l Agar versetzt. Die Bakterien-Stammkulturen, die als Glycerinsuspension (58 %) bei -70 °C lagerten, wurden bei Bedarf auf LB-Agarplatten mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien dieser Übernachtskultur wurden für die Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

Zur Selektion von Transformanten diente LB-Medium oder LB-Agar mit einem Zusatz von 100 mg/l Ampicillin (pSGEM). Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C.

2.7.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen aller Konstrukte wurden kontrolliert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Startpunkte der Sequenzierung wurden durch entsprechende Sequenzierungs-Primer gewählt (siehe Anhang).

2.8 Verfahren mit Ribonukleinsäuren

2.8.1 Synthese von cRNA (*In vitro*-Transkription)

Für die heterologe Expression in *Xenopus laevis* Oozyten wurden das Kcv-wt Gen zunächst in den speziell konstruierten Vektor psGEM (oder pSGEM) in definierter Orientierung kloniert. Hierfür konnten 7 verschiedene Restriktionsstellen im Vektor genutzt werden, welche von den untranslatierten Regionen (5' UTR und 3' UTR, siehe Abbildung 2.1) des *Xenopus* β -Globulin-Gens flankiert sind. Dieses soll eine Diskriminierung der klonierten Gene durch den Translationsapparat der Oozyten verhindern und so die Translationseffizienz erhöhen. Um in der Reaktion cRNA-Moleküle mit einer definierten maximalen Länge zu erhalten, wurden zunächst 5 μ g hochreine Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonuklease *Nhe I* (NEB) linearisiert und danach *Nhe I* für 20 min bei 65°C denaturiert. Die DNA wurde hiernach mittels Phenol/Chloroform (Fluka) Extraktion aufgereinigt. Spuren von Phenol wurden durch erneute Extraktion mit Chloroform entfernt. Die DNA wurde durch Ethanolfällung sedimentiert, von Salzen befreit und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser gelöst. Für die *in vitro*-Transkription wurde das Riboprobe® Combination System-SP6/T7 RNA Polymerase oder RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (beide Promega) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Um eine hohe Translationseffizienz im Oozytensystem zu erreichen bzw. um den Abbau der RNA durch oozyteneigene RNasen zu vermindern, wurde die synthetisierte RNA am 5'-Ende mit einer Cap-Struktur (Ribo m7G Cap Analog, Promega) versehen. Der vollständige Reaktionsansatz wurde für 2-4 h in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert, die synthetisierte RNA dann mit Chloroform/Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die aufgereinigte RNA wurde in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser (*Nuclease-free Water (not DEPC-treated)*, Ambion) aufgenommen.

Alternativ wurde die mit *Nhe I* linearisierte DNA mit dem PCR Purification Cleanup Kit (Qia-

gen) aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde photometrisch quantifiziert und ein Aliquot elektrophoretisch aufgetrennt. Bei hoher Reinheit und effektiver Linearisierung wurden 1-2 µg DNA in die *in vitro*-Transkription eingesetzt (*mMessage mMachine*® T7 Kit, Ambion), wobei das *mMessage mMachine*® T7 Kit schon das Cap-Analog beinhaltet. Der Reaktionsansatz wurde für 2-4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einem RNA Aufreinigungs-Kit die cRNA isoliert (*RNeasy*, Quiagen) und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser (*Nuclease-free Water (not DEPC-treated)*, Ambion) aufgenommen.

Die Ausbeute an cRNA wurde photometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden ca. 500 ng der cRNA in einem denaturierenden RNA-Agarosegel aufgetrennt. Die RNA-Lösung konnte bei -80 °C dauerhaft gelagert werden.

2.8.2 Elektrophoretische Auftrennung von cRNA Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA ermöglicht die qualitative Beurteilung der RNA hinsichtlich möglicher Degradation durch RNase Kontaminationen. Nach der am Photometer bestimmten Konzentration wurden je Probe ca. 500 ng RNA in einem identischen Volumen RNA-Ladungspuffer (Fermentas) aufgenommen und 20 min bei 65 °C denaturiert. Mit der RNA-Leiter wurde identisch vorgegangen. Danach wurden die Proben sofort auf Eis inkubiert. Die Auftrennung erfolgte im 1,5% MEN-Agarosegel mit 1xMEN-Puffer (s.u.) bei konstanter Spannung von 60 V für ca. 45 min. Als Größenstandard dienten RNA-Fragmente definierter Länge (RNA-Leiter, Fermentas). Das Trennungsmuster wurde unter UV-Licht durch die Fluoreszenz des gebundenen Ethidiumbromids sichtbar gemacht und dokumentiert.

0,1% DEPC-H₂O:

1998 ml H₂O_{bidest} mit 2 ml DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat) über Nacht im Abzug rühren lassen. Die Lösung 40 min bei 120 °C autoklavieren.

10xMEN-Puffer mit 0,1% DEPC-H₂O ansetzen:

200 mM MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)

Die Lösung mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.

2.9 Das Heterologe Expressionssystem der *Xenopus laevis* Oozyten

Der südafrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) wird bereits lange in der Wissenschaft eingesetzt, da schon früh erkannt wurde, dass er ein geeignetes Versuchstier darstellt, das sich bis heute zu einem Modellorganismus entwickelt hat. Anfänglich wurde *Xenopus laevis* zur hormonellen Schwangerschaftsdiagnostik oder zum Studium entwicklungsphysiologischer Prozesse herangezogen.

John Gurdon machte 1971 in Cambridge die ersten Experimente mit *Xenopus* Oozyten. Nach mRNA Injektion in *Xenopus* Oozyten konnte eine hohe Expression des exogenen Proteins nachgewiesen werden (Gurdon *et al.*, 1971). Dies führte dazu, dass diese Eizellen heute vermehrt in vielen biologischen Disziplinen eingesetzt werden (Hilken, Iglauer und Richter, 1997).

Mit heterologer Expression, bezeichnet man die Proteinsynthese in einem Zellsystem, welches in der Regel nicht über das zu untersuchende Protein verfügt. *Xenopus* Oozyten wurden erfolgreich eingesetzt, um mRNA oder cDNA in das entsprechende Protein einschließlich posttranslationaler Modifikationen zu translatieren (Gurdon *et al.*, 1971; Mertz *et al.*, 1977; Soreq, 1985). Die Expression zellfremder Proteine in *Xenopus laevis* Oozyten hat viele Vorteile. Zum einen erleichtert die Größe der Oozyte (ca. 1-1.2 mm Durchmesser) Manipulationen wie RNA-Injektion und Penetration mit Messelektroden. Zum anderen ist die Membranoberfläche der Oozyten nur spärlich mit endogenen Ionenkanälen durchsetzt (Dascal, 1987), eine Eigenschaft die *Xenopus laevis* Oozyten zu einem attraktiven Expressionssystem für diese Membranproteine macht.

2.9.1 Haltung von *Xenopus laevis*

Weibliche *Xenopus laevis* mit einer Länge von 10-11 cm wurden von H. Kähler, Hamburg, bezogen. Maximal 15 Frösche belegten ein 150 l Kunststoffbecken, in dem eine ständig betriebene Aquariumpumpe das Wasser belüftete. Die Tiere wurden bei ca. 22 °C Wassertemperatur unter einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Dies geschieht, um auftretenden saisonalen Schwankungen in der Qualität der Oozyten vorzubeugen. Längshalbierte Tonröhren oder Tonplatten dienten als Versteck für die Tiere. Die Frösche wurden zweimal wöchentlich mit Rinderherzstückchen oder Regenwürmern gefüttert, die mit 10 Tropfen Vitaminlösung (Merck Multibionta) beträufelt worden waren.

Um die Gefahr von Infektionsübertragung von einem Becken in ein anderes zu minimieren, war jedes Becken mit einem eigenen Käscher ausgestattet.

2.9.2 Beschreibung von *Xenopus* Oozyten

In erwachsenen *Xenopus laevis* Weibchen verläuft die Oogenese asynchron. Das bedeutet, dass sechs Entwicklungsstadien der Oozyten gleichzeitig vorkommen. Allerdings beinhalten Ovarien von adulten Weibchen hauptsächlich Oozyten der Stadien V und VI (Wagner, 2000). Diese Stadien sind auch die bevorzugten für Expressionsstudien. Die Oozyten der Stadien V und VI sind große, runde Zellen (ca. 1 -1.2 mm Durchmesser) mit einer charakteristischen Erscheinung: die Zelle ist in eine dunkelbraune („animale“) Hemisphäre und eine gelbliche („vegetale“) Hemisphäre geteilt. Die beiden Hemisphären können von einem Äquatorialring getrennt sein. Die animale Hemisphäre, deren Färbung von erhöhter Melanineinlagerung unter der Membranoberfläche herrührt, beherbergt den Zellkern. Die gesamte Oozyte ist von unterschiedlichen zellulären und nicht-zellulären Schichten umgeben. Am nächsten zu der Plasmamembran befindet sich die Vittelinmembran, eine faserige nicht-zelluläre Schicht. Es folgt eine Schicht aus Follikelzellen die über „gap-junctions“ elektrisch mit der Oozyte verbunden sind (Sigel und Minier, 2005).

2.9.3 Präparation und Entnahme der *Xenopus laevis* Oozyten

Oozyten, die das Stadium VI erreicht haben, verbleiben an diesem Punkt der Entwicklung für mehrere Monate, bis sie resorbiert werden. Aus diesem Grund ist es möglich, das gleiche Weibchen nach mehrwöchiger Pause wiederholt zu operieren. Im Folgenden wird ein Protokoll beschrieben, was in vielen Laboratorien Anwendung findet.

Weibliche *Xenopus laevis* (H. Kähler, Hamburg, Deutschland) wurden bei ca. 22 °C Wassertemperatur unter einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden durch Immersion in eine gekühlte Tricaine-Lösung (3-Aminobenzoessäure-Ethylester, A-5040; Sigma; 1,25 g/l) narkotisiert. Der Verlust jeglicher Reflexe stellte sich nach 15-30 min ein und das Tier wurde dorsal auf ein mit nassen Tüchern bedecktes Eisbett gelegt. Ventral wurde das Tier ebenfalls mit nassen Tüchern bedeckt und nur die Operationsstelle unbedeckt gelassen. Hierbei muss die Nase immer der Luft exponiert sein, um das Atmen zu ermöglichen.

Durch einen kleinen (0,5-1,0 cm) abdominalen Einschnitt wurden Ovarloben aus dem Tier entnommen und in sterilfiltriertes Ca^{2+} freies Barth-Medium gelegt.

Nach der Oozyten Entnahme wurden zuerst das Muskelgewebe und die Muskelhaut und dann die Bauchhaut mit zwei bis drei Stichen eines resorbierbaren Fadens vernäht. Die Naht wurde mit einem Antiseptikum behandelt und Reste der Tricainelösung sowie überschüssiges Antiseptikum unter schwach fließendem Wasser abgewaschen. Danach wurde das Tier zum Aufwachen in Leitungswasser gelegt, wobei wieder darauf geachtet werden musste, dass die Nase des Tieres der Luft ausgesetzt war.

2.9.4 Enzymatische Entfernung des Follikelepithels

Die Entfernung der Follikelzellschicht kann entweder vor oder nach RNA-Injektion erfolgen. Dies kann einerseits rein mechanisch von statten gehen oder zusätzlich mittels enzymatischem Verdau. Letzterer beugt mechanischen Beschädigungen der Oozyten vor, kann aber bei zu langer Inkubation die Überlebensrate der Oozyten verringern. Im Folgenden wird ein milder enzymatischer Verdau mit anschließender mechanischer Vereinzelung beschrieben. Die Ovarloben wurden in einer Zellkulturschale in sterilfiltriertem Ca^{2+} -freiem Barthmedium (ca. 215 mOsmol/kg, pH 7.4) gesammelt. In einem ausgebackenen 50 ml Erlenmeyerkolben wurde mit Ca^{2+} -freiem Barthmedium eine Collagenaselösung angesetzt (1-2 mg/ml bei 314 U/mg). Einzelne Teile der Ovarloben wurden in lange Schlangen geschnitten und in kleinen Stücken in die Collagenaselösung gegeben. Der Erlenmeyerkolben mit den zerkleinerten Ovarloben wurde dann in einem Schüttelwasserbad bei 17-18 °C für 75-90 min inkubiert. Zwischenzeitlich musste der Verdauungsgrad kontrolliert werden und nach ausreichender Wirkung der Collagenase wurde der Verdau abgebrochen. Dies geschah mittels mehrerer intensiver Waschschriffe mit sterilfiltriertem Ca^{2+} -freiem Barthmedium. Nachdem die Zellen gewaschen waren, konnte mit Hilfe von Uhrmacherpinzetten (Nr.5, Inox, Dumont) die restliche Follikelzellschicht entfernt werden und Oozyten für die Injektion selektiert werden. Die Inkubation (18 °C) der Zellen erfolgte in Barthmedium (mit Ca^{2+}).

2.9.5 Injektion von cRNA

Die Injektion von cRNA erfolgte ca. 18-24 h nach der Oozyten Präparation. Mittels eines Pipetten-Ziehgeräts (PP-83, Narishige, Japan) wurden steril ausgebackene (4 h, 180 °C) Glas-kapillaren (geschürzte Kapillare, 083204-GX, Drummond) zu Mikropipetten ausgezogen. Die fein ausgezogene Spitze wurde unter dem Stereomikroskop abgebrochen und gegebenenfalls mit einer *Microforge* zu einer weichkantigen Kanüle poliert. Der Durchmesser der Injektionskapillaren betrug ca. 8-12 μm . Da die Injektionskanülen erst kurz vor der Injektion hergestellt wurden, waren diese durch die hohe Temperatur des Ziehvorgangs an der Kapillarspitze absolut RNase-frei. Um beim Injektionsvorgang Unregelmäßigkeiten im injizierten Volumen zu vermeiden, wurden die Injektionskanülen mit Siliconöl befüllt, das eine regelmäßig Kompression bei den Injektionsstößen gewährleistete. Die auf 0,5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellte cRNA-Lösung wurde frontal mittels Injektor (Drummond Microinject, 3-000-203-X, Drummond Scientific, Broomall) aufgesogen. Mithilfe eines kontrollierten Druckstoßes des Injektors konnten zwischen 30-50 ng cRNA pro Oocyte injiziert werden. Die Oozyten wurden zwischen 1-5 Tagen bei ca. 18 °C inkubiert.

2.9.6 Benötigte Lösungen

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angesetzt.

Lösungen zur Präparation und Inkubation von Oozyten

Barthmedium ohne bzw. mit Calcium wurde wie folgt angesetzt:

Barth ohne Calcium:

88 mM NaCl

1 mM KCl

2,4 mM NaHCO_3

0,82 mM MgSO_4

7,5 mM Tris HCl

Barth mit Calcium (zusätzlich zu den Angaben für Barth ohne Calcium):

0,33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,41 mM CaCl_2

Beide Lösungen wurden mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Tricaine Lösung (1l):

1.25 g Tricaine (3-Aminobenzoessäure-Ethylester, Sigma, A-5040) in etwas Leitungswasser lösen.

50ml 0.5M NaHCO_3 zugeben (\rightarrow pH \sim 7)

Die Lösung auf 1l mit Leitungswasser auffüllen und bei 4 °C aufbewahren. Die Tricaine kann mehrmals benutzt werden.

2.10 Elektrophysiologie (*voltage clamp*)

Mitte des 20. Jahrhunderts etablierten Studien wichtige Konzepte über den Zusammenhang von Ionen und der Entstehung eines Aktionspotentials. Durch ein neues experimentelles Verfahren wurden diese Ideen belegt und auf eine überzeugende quantitative Basis gestellt. Das von Marmot (1949), Cole (1949) und Hodgkin, Huxley und Katz (1949, 1952) entwickelte Verfahren wurde als *voltage clamp* (Spannungsklemme) bekannt (Hille, 2002).

Die *voltage clamp*-Technik war Basis zweier Meilensteine der modernen Elektrophysiologie: der Beschreibung eines Aktionspotentials im *Loligo* Riesenaxon durch Hodgkin, Huxley und Katz (Hodgkin, Huxley und Katz, 1952) und der Beschreibung von Einzelkanalereignissen durch E. Neher und B. Sakmann (Neher und Sakmann, 1976).

2.10.1 Das Messprinzip der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (*Two-electrode voltage clamp, TEVC*)

Für die meisten elektrophysiologischen Verfahren an *Xenopus* Oozyten muss das Membranpotential kontrolliert werden. Dies wird über die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme erreicht. Die erste intrazelluläre Elektrode misst das aktuelle intrazelluläre Potential (Spannungselektrode). Die zweite intrazelluläre Elektrode (Stromelektrode) wird benötigt, um genau soviel Strom einzuspeisen, um das angestrebte Potential beizubehalten. Dies wird über eine Rückkopplungsschleife erreicht, einem Hauptbestandteil eines *voltage clamp* Verstärkers. Der benötigte Strom, um das angelegte Potential aufrecht zu erhalten, ist der gemessene Parameter und stellt ein direktes Maß für die Kanalströme dar.

Wie akkurat dieser Parameter gemessen werden kann, hängt auch von zwei zusätzlichen Badelektroden ab; eine Strom-passierende, geerdete Elektrode und eine Referenzelektrode. Das Membranpotential wird als Differenz zwischen der intrazellulären Spannungselektrode und der Referenzelektrode gemessen. Der Gebrauch von zwei Badelektroden hat den Vorteil, dass große Ströme die geerdete Badelektrode passieren und die Referenzelektrode nicht durch Stromfluss polarisiert werden kann (Stühmer, 1992). Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips.

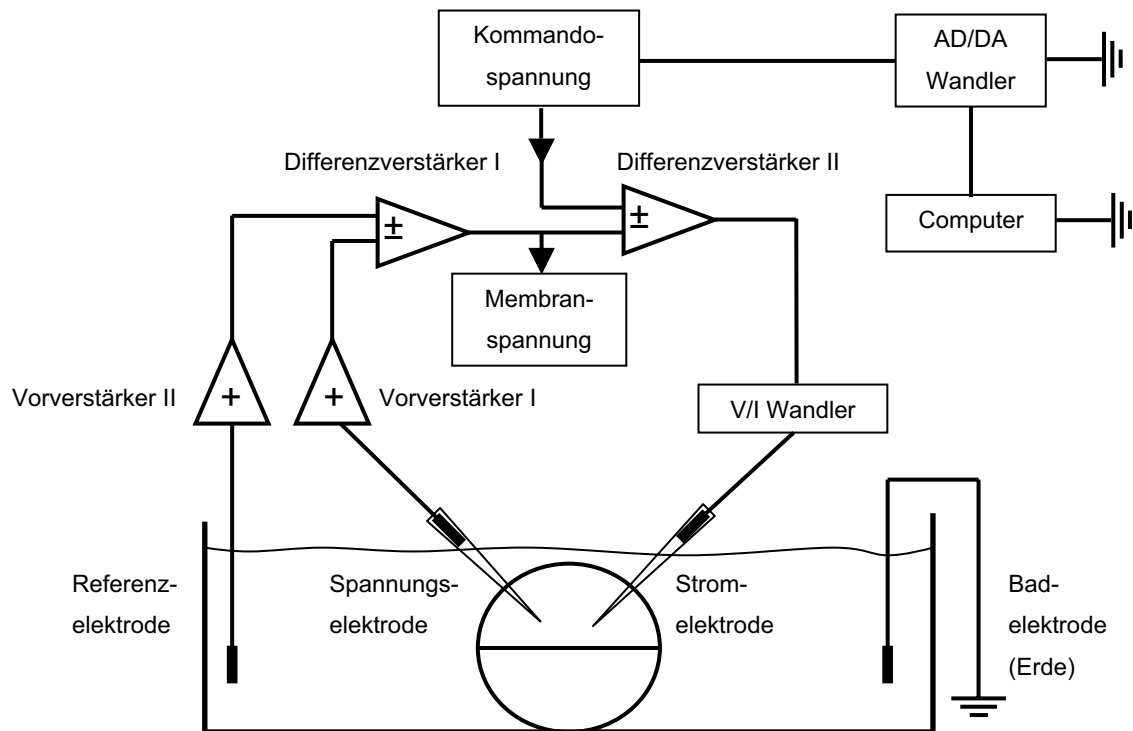


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Messprinzips einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme. Die Vorverstärker I + II verstärken das Signal der Spannungs- bzw. der Referenzelektrode, bevor die Signale in den Differenzverstärker I fließen. Hier wird die an der Oozytenmembran anliegende Spannung ermittelt. Differenzverstärker II vergleicht die vom Computer über einen AD/DA-Wandler applizierte Kommando-spannung mit der an der Oozytenmembran anliegenden Spannung. Die hier ermittelte Differenz ist der zu messende Parameter und stellt ein direktes Maß für die Kanalströme dar. Um die Membranspannung der Kommando-spannung anzugleichen, wird über einen V/I-Wandler genau das Maß an Strom auf die Zelle appliziert, dass an Differenzverstärker II gemessen wurde. Eine zweite Badelektrode erdet das Bad.

2.10.2 Der Messaufbau

Der mechanooptische Teil der Messapparatur umfasste eine Badkammer mit Perfusions-system, die Mikromanipulatoren (Narishige, Japan) und ein Stereomikroskop (Wild, Schweiz) inklusive einer Lichtquelle (Opticube™, Cateye, Japan). Zur mechanischen Entkopplung des Aufbaus war dieser auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert. Zusätzlich sorgte ein Faradaykäfig für eine Abschirmung gegenüber elektrischen Störungen der Umgebung. Die leitenden Bestandteile der Messeinheit wurden über einen Punkt geerdet. Die Badkammer gewährleistete, dass die Oozyten gleichmäßig mit der jeweiligen Messlösung umspült wurden. Die Perfusionsrate betrug während der Messung 0,5 bis 2 ml pro Minute. Als Messverstärker diente ein Gerät der Firma NPI electronics (Turbo TEC-03-X). Dieser war über einen

16 Bit AD/DA-Wandler Karte (NI PCI-6035E, National Instruments, USA) mit einem Messrechner (PC) verbunden, so dass die Stromantwort der Membran anhand des computersimulierten Oszilloskops verfolgt werden konnte. Verschiedene Spannungspuls-Protokolle wurden im Pulsgenerator der Software WinWCP (Dr. John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) erstellt und mittels Computer über den Spannungseingang/-ausgang des Messverstärkers an die Membran angelegt.

2.10.3 Elektroden und Pipetten

Als Mess- und Badelektroden wurden Silber/Silberchlorid-Elektroden verwendet, die durch elektrolytische Chlorierung eines Silberdrahtes (Teflon *coated* AG wire, 0,25 mm, Warner Instruments, USA) in 3 M KCl hergestellt wurden. Die auf die Messelektroden der Vorverstärker applizierten Einstichpipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren mit Hilfe eines Pipetten-Ziehgerätes gezogen. Diese Einstichpipetten wurden mit 3 M KCl-Lösung gefüllt und hatten einen Widerstand von 0,5-1,2 M Ω in 50 mM KCl.

2.10.4 Benötigte Lösungen

Soweit nicht abweichend beschrieben, wurden alle Lösungen mit H₂O _{bidest} angesetzt.

Lösungen für die Elektrophysiologie

Alle Messlösungen enthielten folgende Bestandteile:

1,8 mM CaCl₂

1,0 mM MgCl₂

5 mM Hepes

Für die KCl, NaCl, RbCl und KCl/RbCl Lösungen wurden entsprechende Mengen für 20, 50, 80 und 100 mM eingesetzt und entsprechend mit KOH, NaOH oder RbOH auf pH 7,4 eingestellt. Um die Oozyten osmotisch stabil zu halten, wurden alle Lösungen mit Mannitol auf 215 mOsmol/kg eingestellt.

Die Messlösungen mit Inhibitoren (Barium, Chloroquine und NMG⁺) basierten auf einer 50 mM KCl Standardlösung. Für Barium wurde 1 mM, für Chloroquine 300 μ M und für NMG⁺ 50 mM zusätzlich hinzugefügt und gegebenenfalls die Menge an Mannitol variiert, um die Lösung auf 215 mOsmol/kg einzustellen.

2.11 Datenauswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit den Programmen Excel (Microsoft), WinWCP (© John Dempster, University of Strathclyde, 1996-2002), Clampfit (Axon Instruments) und OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation) analysiert.

2.12 Internetadressen und GenBank Nummern

Sequenz-Datenbanken:

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Das *Paramecium bursaria Chlorella* Virus (PBCV-1)-Genom ist unter NC_000582 eingetragen. Die Sequenz von ORF a250r (*kcv*) hat die Zugangsnummer AY3382212.

3. Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression von Kcv in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Funktionalität eines Kanalproteins oder dessen Mutanten kann in heterologen Expressionssystemen überprüft werden. Ein weit verbreitetes heterologes Expressionssystem sind die Oozyten von *Xenopus laevis*. Die kodierende cRNA wird in die Oozyten injiziert und mittels *voltage-clamp*, einer elektrophysiologischen Messmethode, die entsprechenden Leitfähigkeiten beobachtet. Das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten eignet sich sehr gut für die Untersuchung von membranständigen Proteinen, unter anderem Kanälen, da in den bevorzugten Oozytenstadien eine hohe Expressionsrate zu erwarten ist und nur sehr geringe endogene Leitfähigkeiten auftreten (N. Dascal, 1987).

In bisherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass Kcv in *Xenopus laevis* Oozyten eine charakteristische Leitfähigkeit hervorruft (Plugge *et al.* 2000; Gazzarrini *et al.* 2002), die auch in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden konnte.

In Abbildung 3.1 ist eine charakteristische Stromantwort von H₂O- bzw. Kcv-wt-injizierten Oozyten auf ein Standardpulsprotokoll dargestellt (Abb.3.1/A-C). Das Standardpulsprotokoll besteht aus Spannungsschritten von der Haltespannung bei -20 mV zu Spannungen von +40 mV bis -160 mV; abschließend wird auf -80 mV geklemmt, um die Tailströme aufzuzeichnen. Eine mit Wasser injizierte Oozyte (Abb.3.1/B) zeigt vor dem Hintergrund von 50 mM K⁺ nur eine minimale Stromamplitude als Antwort auf ein Standardpulsprotokoll ($0,2 \pm 0,05 \mu\text{A}$; $n=5$). Die Strom-Spannungs-Beziehung der entsprechend injizierten Oozyte zeigt daher nur eine geringe Leitfähigkeit (Abb.3.1/D, ■).

In Abbildung 3.1/C ist eine typische Stromantwort auf ein Standardpulsprotokoll (Abb.3.1/A) einer mit Kcv-wt injizierten Oozyte bei 50 mM K⁺ im Badmedium dargestellt. Die Stromantwort ist in zwei kinetische Komponenten einteilbar. Diese beiden Komponenten sind der instantane Strom (I_i) und eine träge spannungsabhängige Komponente (I_v), die gemeinsam den *steady state* Strom ergeben (I_{ss}). Der instantane Strom wird sofort nachdem ein Spannungspuls appliziert wurde gemessen (Abb.3.1/D, Δ) und beinhaltet alle Kanäle, die schon während des Vorpulses offen sind.

Der instantane Strom von Kcv-wt ist im Spannungsbereich von ca. +40 mV bis ca. -50 mV weitgehend linear (Abb.3.1/D, Δ) und wird von den ca. 70% permanent offenen Kcv-Kanälen hervorgerufen (Gazzarini *et al.*, 2003). Bei negativeren Spannungen (ab ca. -50 mV) wird der Anteil des instantanen Stroms immer mehr reduziert. Diese Reduktion des Stroms führt zu einer Abweichung von der Linearität bei negativen Spannungen in der Strom-Spannungs-

Beziehung (Abb. 3.1/D, Δ).

Außer der instantanen Stromkomponente zeigt Kcv-wt auch eine träge, spannungsabhängige Komponente der Stromantwort. Diese ist dem instantanen Strom aufgelagert und beinhaltet die Kanäle, die spannungsabhängig schließen oder öffnen.

Abbildung 3.1/C zeigt, dass Kcv-wt bei positiven Spannungen träge inaktiviert (+40 mV und +20 mV) und bei negativen Spannungen (-60 mV bis -160 mV) träge aktiviert.

Die Summe aus instantanem Strom und der trägen spannungsabhängigen Komponente ergibt den *steady state* Strom (I_{ss}) und wird am Ende eines Spannungspulses gemessen (Abb.3.1/D, \bullet). Die Strom-Spannungs-Beziehung (Abb. 3.1/D) zeigt für den instantanen Strom und den *steady state* Strom eine ähnliche Form. Beide (I_i und I_{ss}) zeigen zwischen +40 mV und -50 mV einen weitgehend linearen Verlauf und I_i und I_{ss} sind annähernd gleich groß. Nach Abweichung von der Linearität zeigen I_i und I_{ss} einen Unterschied in der Stromamplitude der genau der Größe der trägen spannungsabhängigen Komponente entspricht. Die Abweichung von der Linearität in I_i und I_{ss} reflektiert die leichte Spannungsabhängigkeit von Kcv-wt.

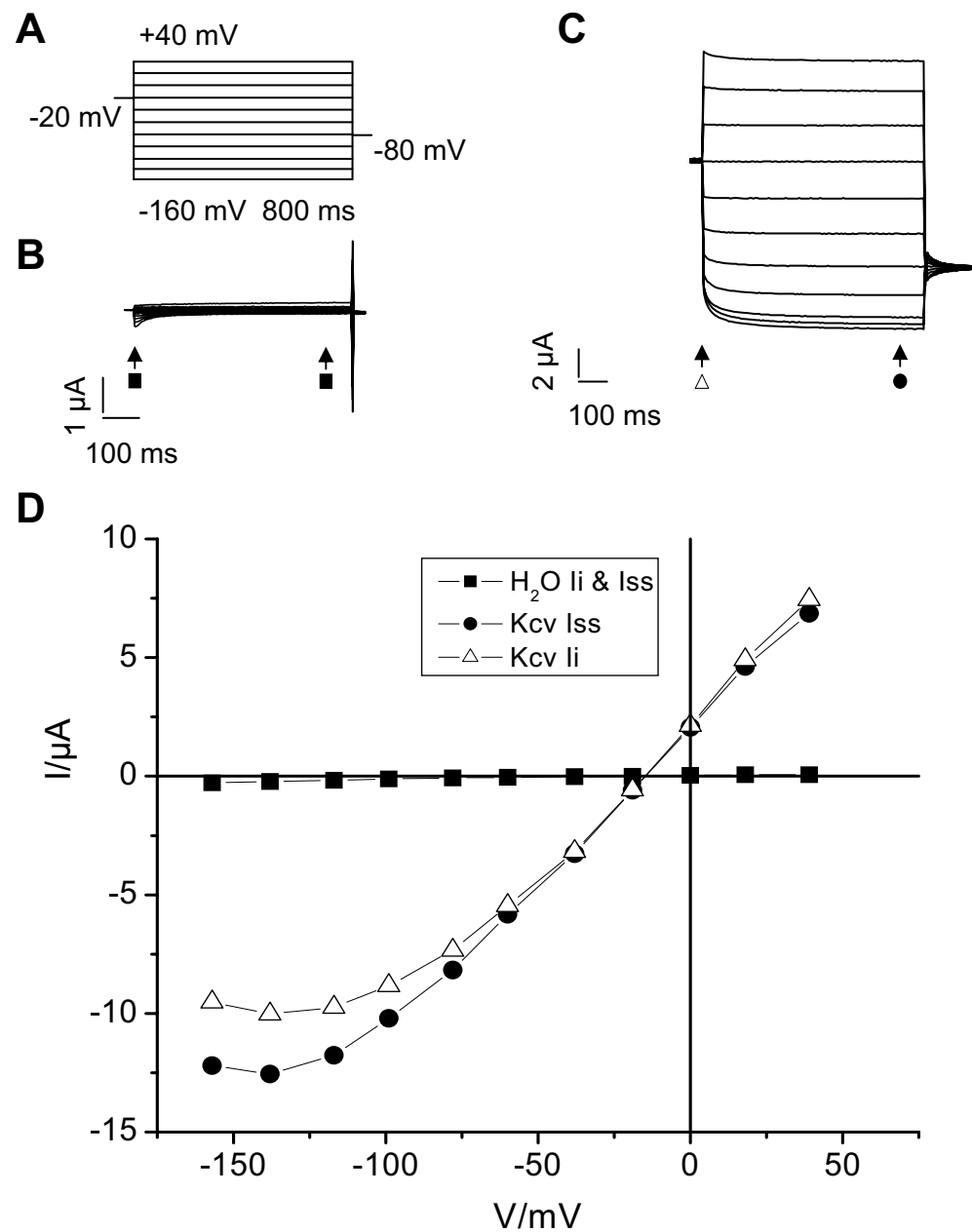


Abb. 3.1: Heterologe Expression von Kcv-wt in *Xenopus laevis* Oozyten

Stromantwort einer H_2O injizierten Oozyte (B) und einer Oozyte nach erfolgreicher Kcv Expression (C) auf ein appliziertes Pulsprotokoll (A). (D) Resultierende Strom-Spannungs-Beziehung der stationären und instantanen Ströme einer H_2O injizierten Oozyte (■) und einer Kcv injizierten Oozyte (●) bzw. (Δ).

Kaliumkanäle werden durch das zweiwertige Kation Barium spannungsabhängig inhibiert. Diese Hemmung beruht auf der Blockierung der Kanalpore durch Barium, das bei negativer Membranspannung in die Kanalpore gezogen wird und so den Einwärtsstrom der Kaliumionen verhindert. Dieser spannungsabhängige Block durch Barium ist ein typisches Merkmal von Kaliumkanälen (Hille 2001).

Auch für Kcv-wt wurde ein steiler spannungsabhängiger Block in *Xenopus laevis* Oozyten durch Barium gezeigt (Plugge *et al.*, 2000). Abbildung 3.2 zeigt den hemmenden Effekt von 1 mM Barium im Badmedium vor dem Hintergrund von 50 mM K⁺ auf die Kcv-wt induzierte Leitfähigkeit. Die Einwärtsströme wurden stärker inhibiert als die Auswärtsströme. Auffällig ist die veränderte Kinetik der Auswärtsströme durch Barium (Abb.3.2/C). Die Kinetik der Auswärtsströme wechselt von einer Inaktivierung ohne Barium (Abb.3.2/B) zu einer Aktivierung mit Barium im Außenmedium (Abb.3.2/C). Diese Beobachtung ist noch nicht ausreichend verstanden und wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Der starke inhibitorische Effekt von Barium auf Kcv-wt ist auch in der Strom-Spannungs-Beziehung zu erkennen (Abb.3.2/D). Die Einwärtsströme sind nahezu vollständig geblockt und die Strom-Spannungs-Beziehung verläuft fast waagerecht bei ca. 0 bis -0,1 μ A für Spannungen negativer als 0 mV (Abb.3.2/D, ■). Bei einer Referenzspannung von -140 mV betrug die prozentuale Hemmung durch 1 mM Barium $91,9 \pm 5 \%$ ($n=7$) gegenüber den Messungen ohne Barium. Die Auswärtsströme von Kcv-wt werden durch Barium ebenso reduziert, doch verläuft der Übergang zwischen starker Hemmung der Einwärtsströme und geringer Hemmung der Auswärtsströme steil. Dies zeigt die Auftragung des relativen Barium-Blocks als Funktion der Spannung (Abb.3.2/E).

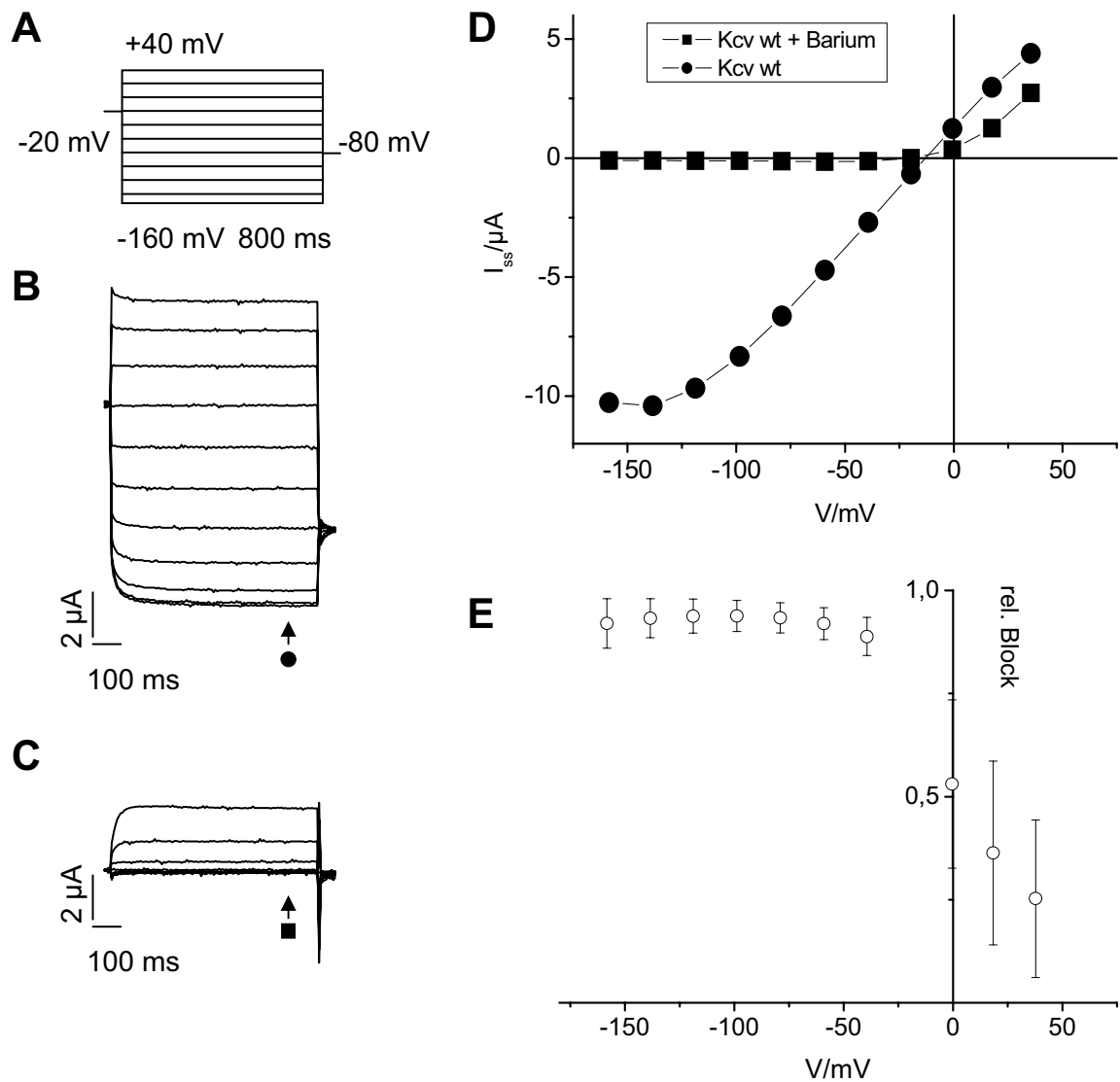


Abb. 3.2: Spannungsabhängiger Barium-Block von Kcv-wt in *Xenopus* Oozyten

Kcv Stromantwort auf ein Standardpulsprotokoll (A) mit (C) und ohne (B) 1 mM Ba²⁺ im Außenmedium vor dem Hintergrund von 50 mM K⁺. (D) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme aus B ohne Barium (\bullet) und (C) mit Barium (\blacksquare); die Stromantworten wurden gegen die tatsächlich gemessenen Spannungen aufgetragen und nicht gegen idealisierte Spannungspulse. (E) Relativer Block der stationären Ströme mit Ba²⁺. Die Berechnung der relativen Hemmung erfolgte mit $1 - I_{ss} Ba / I_{ss}$. Die Daten beinhalten Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von 5 Experimenten.

Ebenfalls einen spannungsabhängigen Block von Kcv-wt ruft die Applikation von Chloroquine im Außenmedium hervor. Chloroquine wurde bisher medizinisch zur Malariavorsorge, Malaria-behandlung und zur Behandlung von durch Protozoen hervorgerufenen Leberkrankheiten eingesetzt.

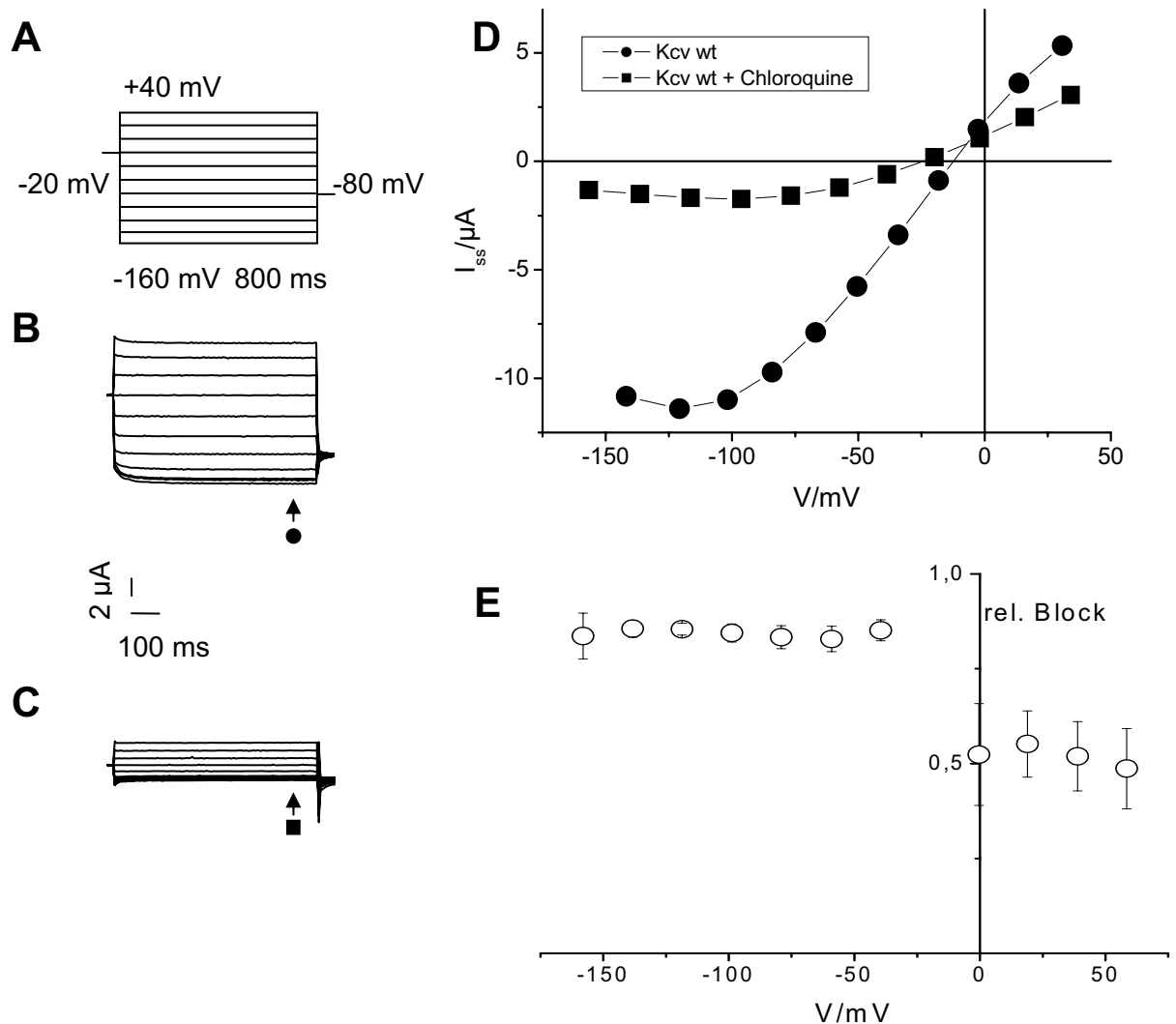


Abb. 3.3: Spannungsabhängiger Chloroquine-Block von Kcv-wt in *Xenopus* Oozyten

Kcv Stromantwort auf ein Standardpulsprotokoll (A) mit (C) und ohne (B) 300 μ M Chloroquine im Außenmedium vor dem Hintergrund von 50 mM K^+ . (D) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme aus (B) ohne Chloroquine (\bullet) und C mit Chloroquine (\blacksquare); die Stromantworten wurden gegen die tatsächlich gemessenen Spannungen aufgetragen und nicht gegen idealisierte Spannungspulse. (E) Relativer Block der stationären Ströme mit Chloroquine. Die Berechnung der relativen Hemmung erfolgte mit $1 - I_{ss} \text{ Chloroquine} / I_{ss}$. Die Daten beinhalten Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von 5 Experimenten.

Der Effekt von 300 μM Chloroquine vor dem Hintergrund von 50 mM K^+ im Außenmedium auf die Stromantwort von Kcv-wt nach Applikation eines Standardpulsprotokolls ist in Abb. 3.3/A-C gezeigt. Die Einwärtsströme von Kcv-wt sind nicht vollständig blockiert. Die Auswärtsströme zeigen keine zeitabhängige Kinetik wie dies bei Ba^{2+} zu beobachten ist (Abb.3.2/C). In der Strom-Spannungs-Beziehung des mit Chloroquine geblockten Kcv-wt (Abb.3.3/D) erkennt man noch einen Anteil des Kcv-wt induzierten Einwärtsstroms. Der relative Block als Funktion der Spannung zeigt, dass Chloroquine die Einwärtsströme nicht so stark blockiert wie Barium (Abb.3.3/E). Die Auswärtsströme werden im Gegensatz zu Barium stärker gehemmt. Der Übergang zwischen Hemmung der Einwärtsströme und verminderter Hemmung der Auswärtsströme verläuft weniger steil als bei Barium, zeigt aber ebenfalls spannungsabhängige Eigenschaften (Abb.3.3/E). Bei einer Referenzspannung von -140 mV betrug die prozentuale Hemmung durch Chloroquine $85,8 \pm 6 \%$ ($n=12$).

Ebenfalls eine spannungsabhängige Hemmung ruft die Applikation von N-methyl-D-Glukamine (NMG^+) bei Kcv-wt hervor. N-methyl-D-Glukamine ist ein strukturell großes, impermeables Kation, dass negative Oberflächenladungen abschirmt und K^+ -Kanäle nicht blockiert (D'Avanzo *et al.*, 2005). Kcv-wt reagiert auf die Applikation von 50 mM NMG^+ mit einer verringerten Stromantwort (Abb.3.4/A-C). Die verminderte Stromantwort wird durch eine Reduktion der Einwärtsströme verursacht (Abb.3.4/D). Die Strom-Spannungs-Beziehung zeigt, dass der inhibitorische Effekt bei Spannungen negativer als ca. -40 mV zunimmt. Die relative Hemmung als Funktion der Spannung (Abb.3.4/E) zeigt ebenfalls den Einfluss von NMG^+ auf die Einwärtsströme. Die Auswärtsströme werden kaum bis gar nicht gehemmt. Bei einer Referenzspannung von -140 mV betrug die prozentuale Hemmung durch 50 mM NMG^+ $18,3 \pm 1,7\%$ ($n=13$) gegenüber den Messungen ohne NMG^+ .

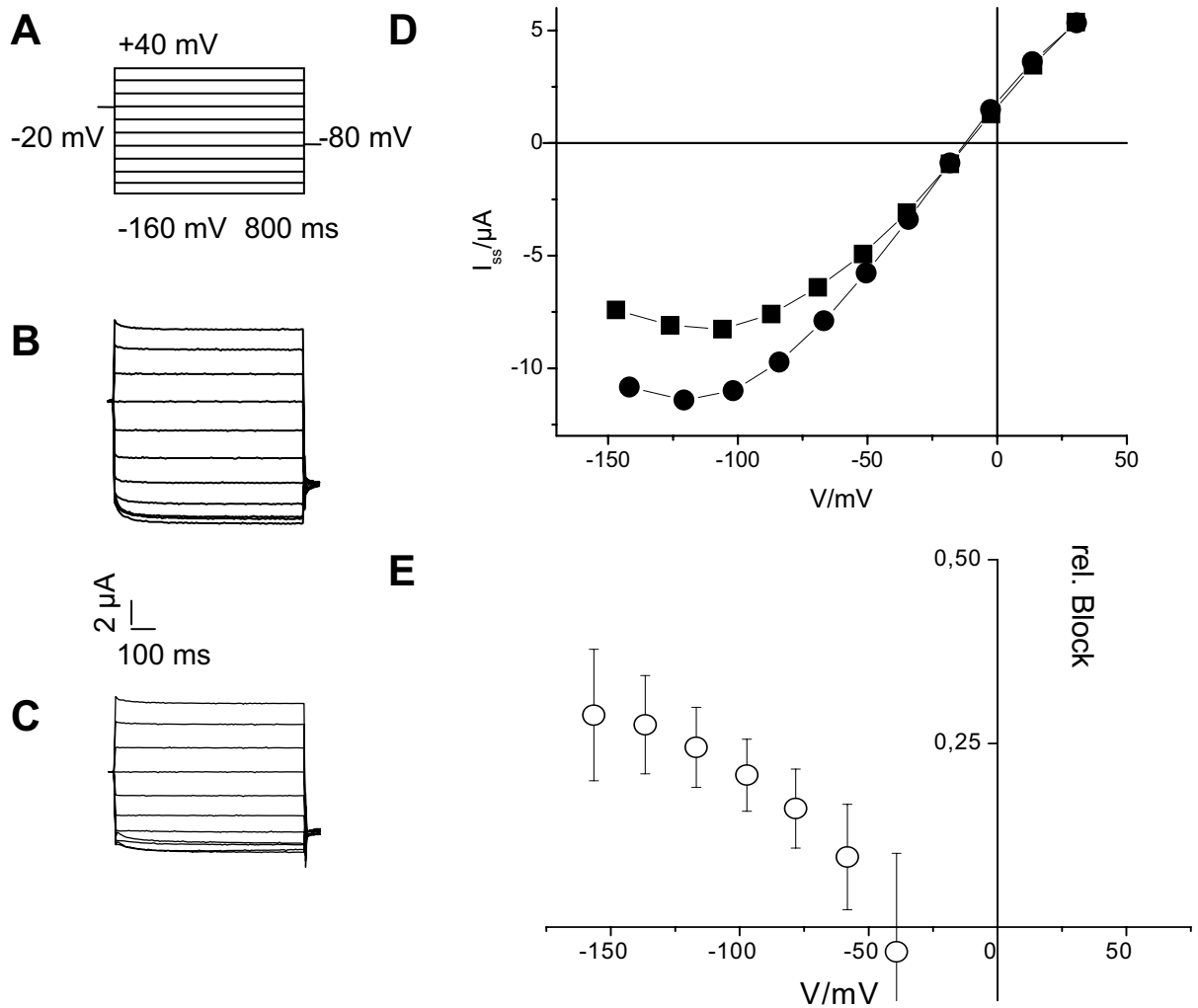


Abb. 3.4: Spannungsabhängige Abschirmung negativer Ladungen mit N-methyl-D-Glukamine (NMG⁺) von Kcv-wt in *Xenopus* Oozyten

Kcv Stromantwort auf ein Standardpulsprotokoll (A) mit (C) und ohne (B) 50 mM NMG⁺ im Außenmedium vor dem Hintergrund von 50 mM K⁺. (D) Strom-Spannungs-Beziehung der stationären Ströme aus B ohne NMG⁺ (●) und C mit NMG⁺ (■); die Stromantworten wurden gegen die tatsächlich gemessenen Spannungen aufgetragen und nicht gegen idealisierte Spannungspulse. (E) Relative Hemmung der stationären Ströme durch NMG⁺. Die Berechnung der relativen Hemmung erfolgte mit $1 - I_{ss} \text{ NMG}^+ / I_{ss}$. Die Daten beinhalten Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von 5 Experimenten.

3.2 Zielgerichtete Mutationen an geladenen Aminosäuren im extrazellulären Teil von Kcv-wt

Elektrostatische Kräfte, die von geladenen Gruppen auf der Oberfläche von Proteinen ausgehen, können makromolekulare Funktion von Proteinen beeinflussen. In Ionenkanälen können selbst Oberflächenladungen, die entfernt vom Selektivitätsfilter liegen, Auswirkungen auf die Leitfähigkeit haben (D'Avanzo *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 1999 & 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von zielgerichteter Mutagenese einzelne geladene Aminosäuren ausgetauscht und so Informationen über die Relevanz der verschiedenen Ladungen für die Kanalfunktion gewonnen.

Eine Übersicht über die mögliche Lage der untersuchten Aminosäuren bietet Abb.3.5. In Abb.3.5/A sind die Aminosäuresequenz und die Primärstruktur von Kcv-wt dargestellt. Die Primärstruktur von Kcv-wt besteht aus zwei Transmembranhelices, einer Porehelix, der Filterregion und dem „Turret“. Der Filter beinhaltet die für K⁺-Kanäle charakteristische Signalsequenz TXCTXG(Y/F)G. Darauf folgt ein Aspartat, das eine negative Ladung trägt und in vielen K⁺-Kanälen konserviert ist. In der Porehelix ist ebenfalls ein Aspartat lokalisiert. In der Region des „Turret“, einer schlaufenähnlichen Struktur die einen Teil der externen Oberfläche bildet (Abb.3.5/B), liegen in Reihe zwei Lysine und ein Aspartat. Die aufgezählten Aminosäuren sind Teil der Untersuchung und farblich hervorgehoben. Abbildung 3.5/B zeigt die Seitenansicht eines Modells von zwei Kcv-wt Monomeren. Im linken Monomer sind im gleichen Farbcode wie in Abb. 3.5/A die relevanten Ladungen gekennzeichnet. Abbildung 3.5/C zeigt die Aufsicht auf ein Kcv-wt Tetramer. Dieses wurde auf die Kristallstruktur von KirBac 1.1 (Kuo *et al.*, 2003) modelliert und zeigt die putativen Oberflächenladungen des Proteins. Hierbei sind negativ geladene Bereiche rot und positiv geladene Bereiche blau dargestellt.

Im Focus der Untersuchung stehen folgende an der äußeren Oberfläche des Kcv-wt Proteins gelegenen bzw. die extrazelluläre Oberfläche beeinflussenden Aminosäuren:

- Aspartat an Position 52 innerhalb der Porenhelix, eine azide Aminosäure mit geladener polarer Seitenkette;
- Aspartat an Position 45 innerhalb der *Turret*-Domäne an der äußeren Oberfläche des Kanals;
- Zwei Lysin an Position 46 und 47 sind basische Aminosäuren mit geladener polarer Seitenkette und befinden sich ebenfalls innerhalb der *Turret*-Domäne an der äußeren Oberfläche des Kanals;
- Aspartat an Position 68, das am extrazellulären Eingang des Filters liegt und einen Ring aus negativen Ladungen um die Pore bildet (Abb. 3.5).

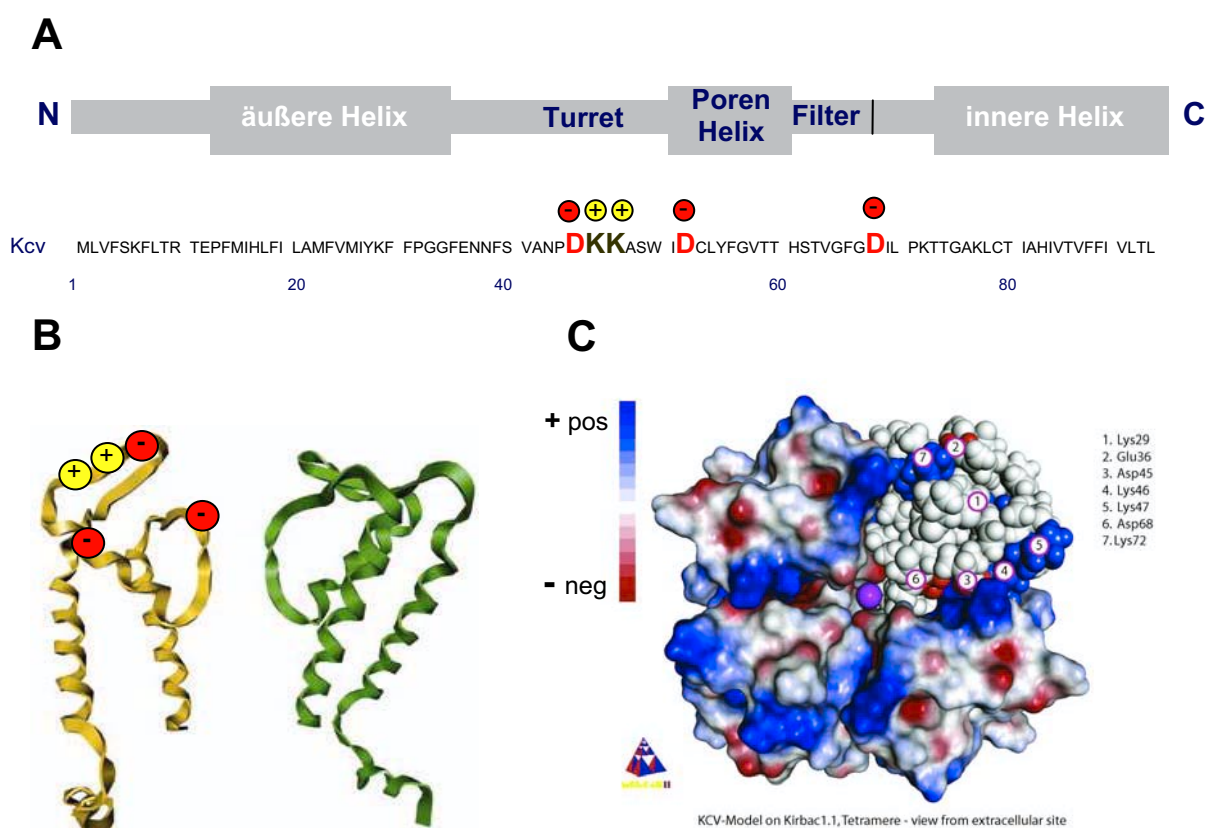


Abb. 3.5: Übersicht der Positionen der untersuchten Aminosäuren

Unterhalb der Primärstruktur befindet sich die Sequenz der 94 Aminosäuren von Kcv-wt mit optisch hervorgehobenen Ladungen (A). In (B) zweidimensionale Seitenansicht von auf KirBac 1.1 modelliertem Kcv mit Positionen der Aminosäuren. Dreidimensionale Aufsicht mit Ladungskartierung von auf KirBac 1.1 modelliertem Kcv-wt (C). Modellierung von S. Tayefeh und Dr. S. M. Kast.

An den beschriebenen Positionen wurden unterschiedliche Mutationen erstellt. Zur besseren Übersicht der angefertigten Mutationen folgt eine tabellarische Aufstellung. Als nicht funktionell wurden Mutanten eingestuft, die nach Herstellung von mindestens zwei DNA Präparationen und anschließender cRNA Injektion in mindestens zwei verschiedene Oozytenchargen keine Stromantwort gezeigt haben. Als funktionell, mit geringer Expressionsrate wurden Mutanten eingestuft, die nach mehrmaliger Injektion in verschiedene Oozytenchargen einen Strom relativ zum Wildtyp zwischen 0 % und 15 % zeigten. Als funktionell wurden die Mutanten eingestuft, die regelmäßig in verschiedenen Oozytenchargen eine erhöhte Leitfähigkeit und einen Strom relativ zum Wildtyp von mehr als 40 % zeigten.

Tab. 3.1: Tabellarische Aufstellung der angefertigten Mutationen

nicht funktionell: Nach Herstellung von mindestens zwei DNA Präparationen und anschließender cRNA Injektion in mindestens zwei verschiedene Oozytenchargen keine Stromantwort zu beobachten;

funktionell, geringe Expressionsrate: Mehrmalige Injektion in verschiedene Oozytenchargen mit einer Expressionsrate zwischen 0 % und 15 % pro Charge;

funktionell: Erhöhte Stromantwort und eine Expressionsrate von mehr als 40 % in verschiedenen Oozytenchargen;

Eigenschaften wie Kcv-wt: Vergleichbare phänotypische Eigenschaften wie Kcv-wt.

*: Diese Mutanten wurden noch nicht ausreichend untersucht.

◇: Diese Mutanten werden näher charakterisiert.

<u>Mutante</u>	<u>Funktion</u>
*D45N&K46A, D45N&K46R, D45N&K47A, D45N&K47R, D68E, D68L, D68S, D68T	
D52A	nicht funktionell
D52K	nicht funktionell
D52V	nicht funktionell
D52R	nicht funktionell
D52H	nicht funktionell
E36A	nicht funktionell
K72A	nicht funktionell
K72V	nicht funktionell
D45V	nicht funktionell
K46E	nicht funktionell
K46D	nicht funktionell
K47E	nicht funktionell
K47D	nicht funktionell

D45A,K46A,K47A	funktionell, geringe Expressionsrate
D52E	funktionell, geringe Expressionsrate
D52N	funktionell, geringe Expressionsrate
D45A	funktionell, geringe Expressionsrate
K47H	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
K46H	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
D45E ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt, geringe Expressionsrate
K46A,K47A ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt, geringe Expressionsrate
D45N ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
K46A◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
K46R ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
K47A ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
K47R ◇	funktionell, Eigenschaften wie Kcv-wt
D68N ◇	funktionell, neuer Phänotyp

Mutationen an dem potentiell negativ geladenen Aspartat in der Porehelix (D52 siehe Abb.3.5 und Abb. 3.5A), haben entscheidende Auswirkungen auf die Funktion des Ionenkanals. Wird die potentielle negative Ladung durch eine positive (D52K, D52R) oder eine positiv polarisierbare Aminosäure (D52H) ersetzt, konnte keine Funktion festgestellt werden. Wird die Position 52 neutralisiert (D52A, D52V), zeigte sich ebenfalls keine Funktion. Nur wenn die potentiell negative Ladung erhalten bleibt (D52E) bzw. die Seitenkette neutralisiert aber polar ist (D52N), konnte eine Funktion festgestellt werden. Allerdings zeigten nur vereinzelte Oozyten eine spezifische Leitfähigkeit. In Abbildung 3.5A ist exemplarisch für die Mutante D52N und D52E eine Stromantwort von D52N vor dem Hintergrund von 50 mM K⁺ dargestellt. Die Stromantwort zeigt keine spezifischen Eigenschaften von Kcv-wt. Chloroquine hat keine inhibitorische Wirkung, sondern scheint eine erhöhte Leitfähigkeit zu bewirken. Für definitive Aussagen über spezifische Eigenschaften der beiden Mutanten ist die Datenmenge für D52N und D52E zu gering.

D52 liegt vermutlich dicht unterhalb der extrazellulären Kanaloberfläche und könnte koordinative Wechselwirkungen mit D68 (Heginbotham *et al.*, 2004) und/oder anderen geladenen Aminosäuren wie K29, K46 oder K47 eingehen und so an zentraler Stelle für die Stabilität des Kanals von Bedeutung sein. Die geringe Expressionsrate könnte auf veränderte Struktureigenschaften hindeuten, die den Proteinaufbau und die Sortierung innerhalb der Zelle beeinflussen.

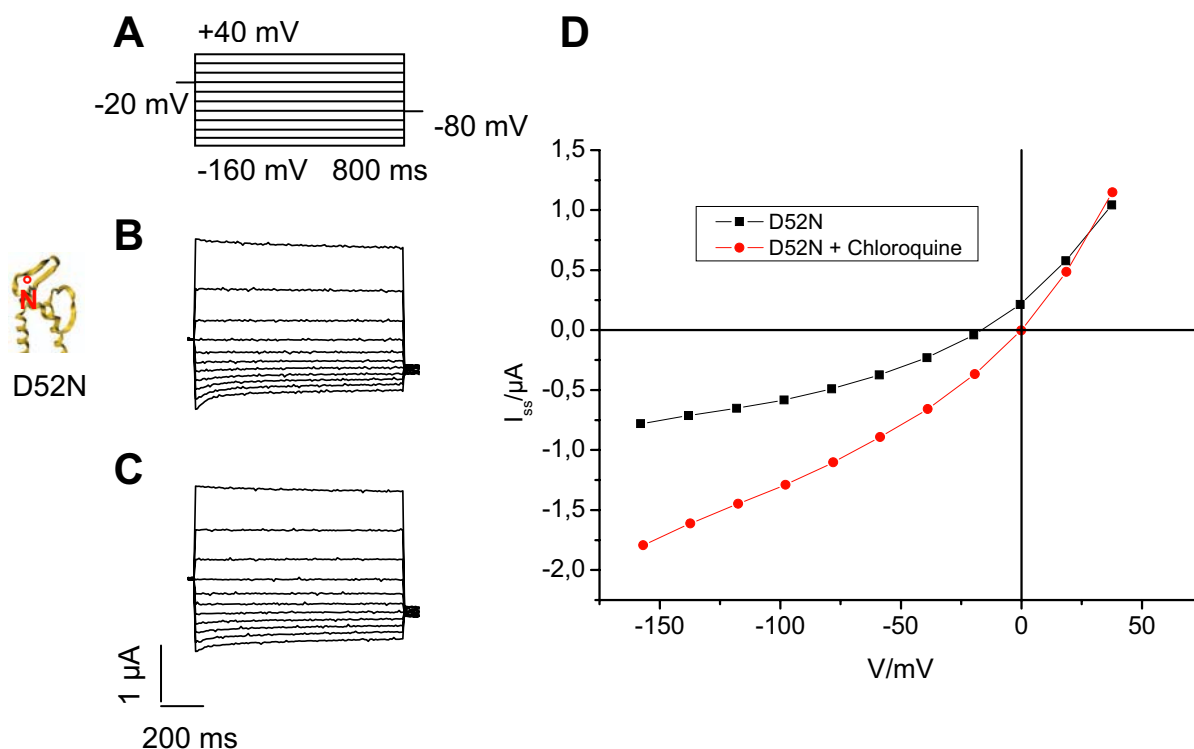


Abb. 3.5A: Exemplarische Darstellung einer Stromantwort von D52N

Stromantwort von D52N vor dem Hintergrund von 50 mM K^+ (B) auf ein Standardpulsprotokoll (A). (C) zeigt die Stromantwort nach Perfusion mit zusätzlich 300 μ M Chloroquine. Die resultierende Strom-Spannungs-Beziehung zeigt eine erhöhte Leitfähigkeit nach Applikation von Chloroquine (D).

Das Glutamat an Position 36 (E36) und das Lysin an Position 72 (K72) befinden sich jeweils direkt hinter der äußeren bzw. inneren Helix auf der extrazellulären Seite des Kanals (Abb.3.5/A). Innerhalb des gefalteten Monomers liegen beide Ladungen direkt nebeneinander. Der Austausch der negativ (E36) bzw. positiv (K72) geladenen Aminosäuren mit neutralen Aminosäuren (E36A, K72A, K72V) bewirkte den Funktionsverlust des Kanals. Dies könnte ebenfalls auf die stabilisierende Funktion dieser Ladungen hindeuten. Zudem könnten diese an der Peripherie des Monomers gelegenen Ladungen (Abb.3.5) auf die Tetramerisierung des Kanals Einfluss nehmen. Diese Positionen bieten weiteren Raum für Mutationsstudien.

Die geladenen Aminosäuren zwischen der ersten Transmembranhelix und der Poren-Region (Turre-Domäne) standen im Focus der Untersuchung. Studien an anderen Kaliumkanälen ergaben, dass die hier positionierten Ladungen einen erhöhten Einfluss auf das Kanal-Gating und somit auf die Kanalfunktion haben (Talukder *et al.*, 1995; Elinder und Arhem, 1999). Die drei aufeinander folgenden Ladungen D45, K46 und K47 (Abb.3.5) wurden durch die Substitution mit Alanin neutralisiert, wobei die Kanalfunktion erhalten blieb. Ebenso funktionell bleiben die Doppelmutante K46A/K47A und die Tripelmutante D45A/K46A/K47A.

Bleibt bei der Aminosäure-Substitution die Ladung erhalten (D45E, K46R, K47R) oder wird eine potentiell polarisierbare Aminosäure eingebaut (D45N, K46H, K47H), werden ebenfalls funktionelle Kanäle exprimiert. Werden die positiven Ladungen an den Positionen 46 und 47 durch negative Ladungen ersetzt, konnte keine Funktion mehr festgestellt werden (K46E, K47E, K46D, K47D).

Die in Tab.3.1 mit einem Diamanten (◊) gekennzeichneten Mutanten wurden weiter charakterisiert. Hierbei war auffällig, dass sich Kcv-wt und die Mutanten in der Höhe der Stromamplitude signifikant unterscheiden (Abb. 3.6 und Tab. 3.2). Zur Veranschaulichung wurden jeweils Messungen bei -140 mV aus verschiedenen Oozytenchargen gemittelt. Bei der Interpretation der Daten ist trotzdem Vorsicht geboten, da sich die Translationskapazität von Oozyte zu Oozyte und innerhalb der Oozytenchargen unterscheidet. Zudem wurde die RNA-Quantifizierung teilweise in einem großen Volumen durchgeführt, und die Injektion kleiner RNA-Volumen (ca. 50 nl/Oozyte) birgt das Risiko, leicht abweichende RNA-Konzentrationen pro Oozyte zu injizieren. Diese Fehlerquellen sollten für Kcv-wt sowie alle Mutanten zu vergleichen sein und durch die gemittelten Werte eliminiert werden. Wird ein t-Test auf die Daten angewendet, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kcv-wt und allen untersuchten Mutanten.

Tab. 3.2: Gemittelte Stromantworten bei -140 mV für Kcv-wt und die Kcv-Mutanten

Daten zu dem in Abb. 3.6 dargestelltem Balkendiagramm. Die Angabe der Daten erfolgt in absoluten Zahlen.

	$I_{ss}/\mu A$	n
Kcv-wt	$6,8 \pm 3,3 \mu A$	n=11
K46A	$2,9 \pm 1,3 \mu A$	n=10
K47A	$2,5 \pm 0,5 \mu A$	n=7
K46A/K47A	$2,0 \pm 0,1 \mu A$	n=4
K46R	$2,5 \pm 0,8 \mu A$	n=6
K47R	$1,8 \pm 0,4 \mu A$	n=3
D45N	$2,0 \pm 0,9 \mu A$	n=9
D68N	$2,9 \pm 1,4 \mu A$	n=6

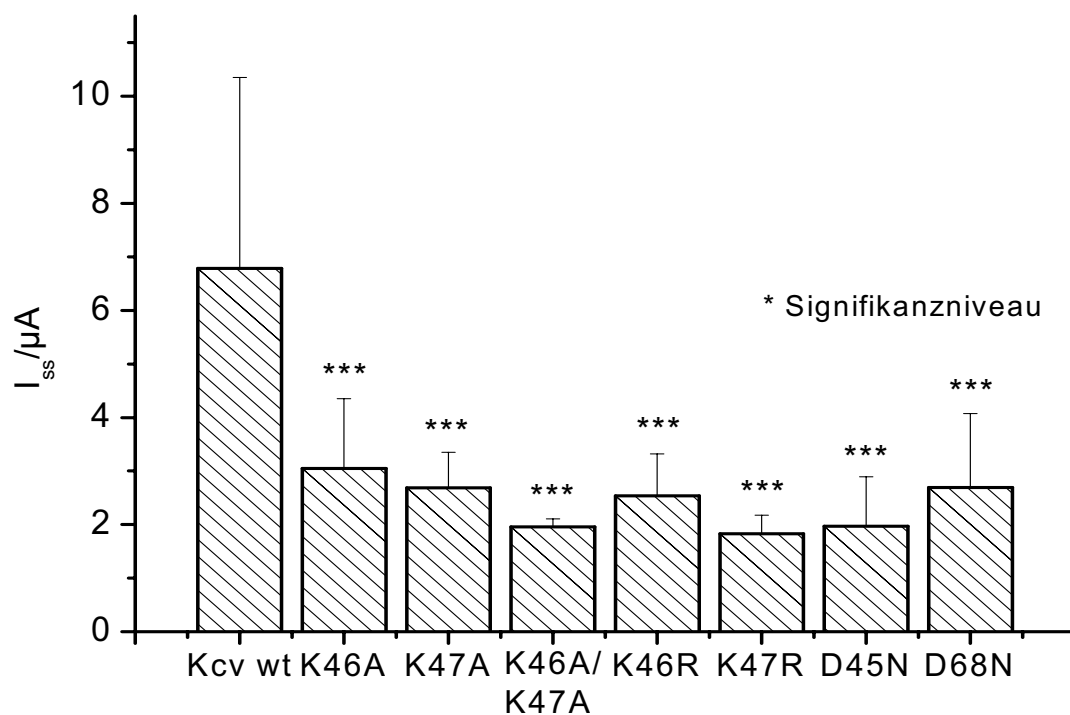


Abb. 3.6: Gemittelte Stromantworten bei -140 mV für Kcv-wt und die Kcv-Mutanten

Gemittelte Stromantworten bei -140 mV aus verschiedenen Oozytenchargen in absoluten Zahlen. Bei der Interpretation der Daten ist trotzdem Vorsicht geboten, da sich die Translationskapazität von Oozyte zu Oozyte und innerhalb der Oozytenchargen unterscheidet. Die ermittelten Daten hierzu finden sich in Tab. 3.2.

3.2.1 Vergleich zwischen Kcv-wt und den Mutanten K46A, K47A und der Doppelmutante K46A/K47A

Bei den Mutanten K46A, K47A und K46A/K47A wurde jeweils die basische und polare Aminosäure Lysin gegen die unpolare, aliphatische Aminosäure Alanin ausgetauscht. Diese Mutation neutralisiert die potentiell positive Ladung an den Positionen 46 und 47.

In Abbildung 3.7 sind die Stromantworten der Mutanten auf ein Standardpulsprotokoll dargestellt (Abb. 3.7/A-D). Die Mutanten K46A und K47A zeigen ähnliche phänotypische Merkmale wie Kcv-wt, d.h. einen hohen instantanen Strom, der bei extrem negativen Spannungen reduziert wird, und eine aufgelagerte zeitlich aktivierende Komponente bei negativen Spannungen. Bei +40 mV zeigen die Mutanten K46A und K47A wie Kcv-wt eine geringe zeitliche Inaktivierung. Die Doppelmutante K46A/K47A zeigt ein inverses Verhalten zu Kcv-wt, d.h. sie aktiviert bei positiven Spannungen und zeigt keine träge Stromzunahme bei negativen Spannungen (Abb. 3.7/D). Diese phänotypischen Übereinstimmungen bzw. Unterschiede sind auch im Vergleich der gemittelten Strom-Spannungs-Beziehungen des stationären Stroms zu erkennen (Abb. 3.7/F). Hierbei wurden die gemittelten Strom-Spannungs-Beziehungen von Kcv-wt bzw. der einzelnen Mutanten jeweils auf -100 mV normiert, um eine mögliche Erhöhung oder Verminderung der Abweichung von der Linearität zu veranschaulichen.

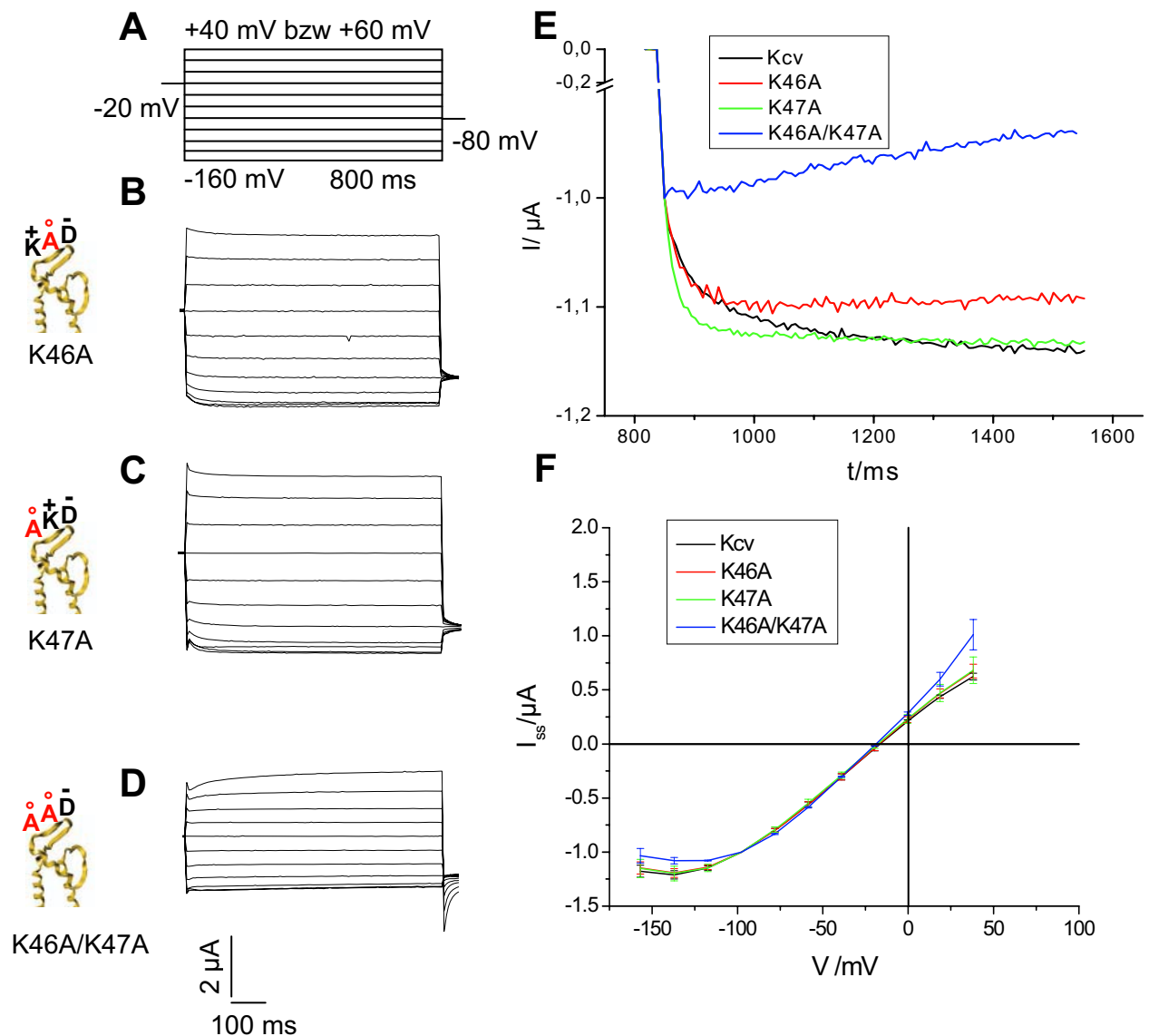


Abb. 3.7: Heterologe Expression der Kcv-Mutanten K46A, K47A und K46A/K47A in *Xenopus* Oozyten

Stromantworten der Mutanten K46A, K47A und der Doppelmutante K46A/K47A (B-D) auf Spannungspulse von +40 mV (bzw. +60 mV) bis -160 mV (A). Einzelspurvergleich bei -140 mV. Der zum Zeitpunkt t_0 anliegende Strom wurde auf Null verrechnet und der Strom zu Beginn der trägen spannungsabhängigen Komponente auf -1 normiert (E). (F) Vergleich der auf -100 mV normierten Strom-Spannungsbeziehung von Kcv-wt (n=8) mit K46A (n=8), K47A (n=5) und K46A/K47A (n=4). Am linken Bildrand: Schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Die Strom-Spannungs-Beziehungen der Mutanten K46A und K47A verlaufen nahezu identisch mit der Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt. Die Doppelmutante K46A/K47A zeigt aufgrund der fehlenden zeitlichen Aktivierung bei Spannungen negativer als -100 mV eine stärkere Inaktivierung als Kcv-wt und die beiden Mutanten K46A und K47A. Die träge zeitli-

che Aktivierung der Doppelmutante K46A/K47A bei positiven Spannungen wird in der Strom-Spannungs-Beziehung durch erhöhte Auswärtsströme reflektiert und zeigt somit eine deutliche Abweichung in der Spannungsabhängigkeit zu Kcv-wt.

Außerdem fällt auf, dass die Stromamplituden von Kcv-wt (Abb. 3.1/C, 3.2/B, 3.3/B und 3.4/B) und den Mutanten (Abb. 3.7/B-D) sich in ihrer Größe deutlich unterscheiden. Werden jeweils mehrere Messungen gemittelt, ergibt sich folgendes Bild: Kcv-wt $6,8 \pm 3,3 \mu\text{A}$ ($n=11$), K46A $2,9 \pm 1,3 \mu\text{A}$ ($n=10$), K47A $2,5 \pm 0,5 \mu\text{A}$ ($n=7$) und für K46A/K47A $2,0 \pm 0,1 \mu\text{A}$ ($n=4$).

Zum Vergleich der Kinetik von Kcv-wt und den Kcv-Mutanten wurden Einzelstromspuren (bei -140 mV) genormt und miteinander aufgetragen (Abb. 3.7/E). Hierzu wurde der zum Zeitpunkt t_0 des Spannungspulses anliegende Strom auf Null verrechnet und der Strom zu Beginn der trägen spannungsabhängigen Komponente auf -1 normiert. Die Normierung des instantanen Stroms auf -1 veranschaulicht die Unterschiede in der Kinetik der einzelnen Stromantworten.

Im Vergleich der Einzelspuren bei -140 mV (Abb. 3.7/E) zeigt Kcv-wt eine biphasische Aktivierung, mit einer schnellen Aktivierung im ersten Teil und einer langsamen Aktivierung im zweiten Teil der Stromantwort. Die Mutante K46A weist zu Anfang eine ähnlich steile Aktivierung auf wie Kcv-wt, doch nimmt der Strom in der zweiten Phase der Stromantwort nicht wie bei Kcv-wt zu, sondern erfährt eine Inaktivierung im weiteren Verlauf der Messung. K47A zeigt eine deutlich steilere Aktivierung als Kcv-wt und K46A und eine flachere Stromamplitude als Kcv-wt im zweiten Teil der Stromantwort. Bei der Doppelmutante K46A/K47A erkennt man, dass keine schnelle zeitliche Aktivierung vorhanden ist, aber eine langsame zeitliche Inaktivierung, die den Verlauf der Stromantwort prägt.

Der Vergleich der Einzelspuren aus Abb. 3.7/E bietet nur einen stichprobenartigen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Stromantworten. Um einen besseren Einblick in den Verlauf der trägen spannungsabhängigen Komponente zu gewinnen, wurden 100 aufeinander folgende Pulse appliziert und das Ergebnis nach Abzug des instantanen Stroms für die zeitliche Komponente gemittelt. Hierzu wurden die Zellen ausgehend von einer Haltespannung von +40 mV auf -100 mV geklemmt (Abb. 3.9/A-D). In Abbildung 3.8 ist am Beispiel von Kcv-wt der gewonnene Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) der zeitlichen Komponente dargestellt. Die Standardabweichung liegt bei diesem Beispiel zwischen $0,02 \mu\text{A}$ in der ersten Phase und $0,016 \mu\text{A}$ in der zweiten Phase der Stromantwort.

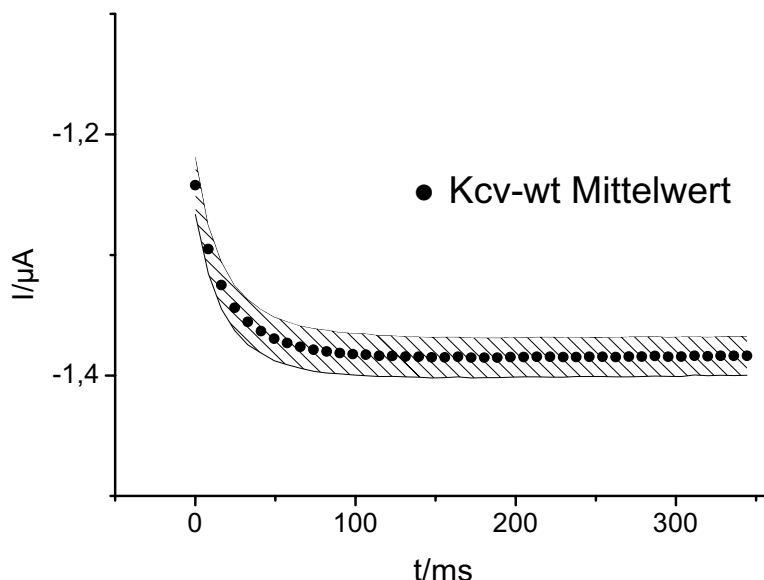


Abb. 3.8: Kcv-wt Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der trägen spannungsabhängigen Komponente nach Applikation von 100 aufeinander folgenden Pulsen

Auf eine Oozyte wurden 100 aufeinander folgende Spannungspulse von +40 mV auf -100 mV appliziert (Abb. 3.9/A). Aus den Stromantworten auf die 100 Pulse (Abb. 3.9/B) wurde die träge spannungsabhängige Komponente ermittelt und der Mittelwert berechnet (Abb. 3.8/• & Abb. 3.9/E). Um die Varianz der einzelnen Stromantworten zu verdeutlichen, ist die Standardabweichung (SD) als schraffierte Fläche dargestellt (Abb. 3.8). Die Standardabweichung liegt bei diesem Beispiel zwischen 0,02 μA in der ersten Phase und 0,016 μA in der zweiten Phase der Stromantwort.

Um die unterschiedliche Kinetik der spannungsabhängigen Kanalaktivierung bzw. Kanalinaktivierung vergleichbar zu machen, wurden die gemittelten Stromantworten mehrerer Oozyten auf Null (Abb. 3.9/E) bzw. auf Null und -1 normiert (Abb. 3.9/F). Die normierte träge spannungsabhängige Komponente konnte mit einer doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) beschrieben und zwei Zeitkonstanten ermittelt werden (Tab. 3.3).

$$y = y_0 + A1 \times e^{(-x/\tau_1)} + A2 \times (1 - e^{(-x/\tau_2)}) \quad (\text{Gleichung 1})$$

y_0	= Achsenversatz (<i>offset</i>)
$A1$	= Amplitude der ersten Funktion
$A2$	= Amplitude der zweiten Funktion
τ_1	= Zeitkonstante der ersten Funktion (schnelle Aktivierung)
τ_2	= Zeitkonstante der zweiten Funktion (langsame Aktivierung)

In Abbildung 3.9 sind exemplarisch zwei Spannungspulse von +40 mV auf -100 mV (Abb. 3.9/A) und die entsprechenden Stromantworten mit instantanem Strom und der trägen Komponenten von Kcv-wt, K46A und K47A (Abb. 3.9/B-D) dargestellt. Der gemittelte und auf eine gemeinsame Ordinate ($t_0=0$) normierte Verlauf der trägen Komponente ist in Abb. 3.9/E aufgetragen und zeigt generell einen biphasischen Verlauf. Die Referenzmessungen für Kcv-wt ($n=3$) zeigt eine schnelle Aktivierung zu Anfang des Spannungspulses und einen langsamen, weiterhin aktivierenden Verlauf in der zweiten Phase der Stromantwort. Der biphasische Verlauf von K46A ($n=2$) zeigt sich zu Anfang schnell aktivierend und eine langsame Inaktivierung im weiteren Verlauf der Messung. Bei K47A ($n=3$) ist ebenfalls eine schnelle Aktivierung und eine langsame Inaktivierung zu beobachten.

Die auf Null und -1 genormte träge Komponente ($t_0=0$; $t_{340}=-1$) verdeutlicht den zeitlichen Verlauf der Messungen und zeigt eine systematische Abweichung der beiden Mutanten gegenüber Kcv-wt auf (Abb. 3.9/F). Gegenüber Kcv-wt verlaufen K46A und K47A ähnlich steil in der ersten Phase, inaktivieren dann aber deutlich im weiteren Verlauf. Dies bestätigen auch die zwei ermittelten Zeitkonstanten (Tab. 3.3). Die erste Zeitkonstante (τ_1) liegt für Kcv-wt bei $10,9 \pm 0,2$ ms. Für die beiden Mutanten K46A ($17,1 \pm 0,2$ ms) und K47A ($19,9 \pm 0,2$ ms) wurden erste Zeitkonstanten ermittelt, die etwa im Bereich von Kcv-wt liegen. Den weiteren Verlauf der Stromantwort beschreibt die zweite Zeitkonstante (τ_2). Kcv-wt lag hier bei $38,05 \pm 0,4$ ms, dies beschreibt die weitere langsame Aktivierung. K46A ($420,5 \pm 10,5$ ms) und K47A ($447 \pm 21,4$ ms) zeigen beide eine träge Inaktivierung. Alle ermittelten Zeitkonstanten werden in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

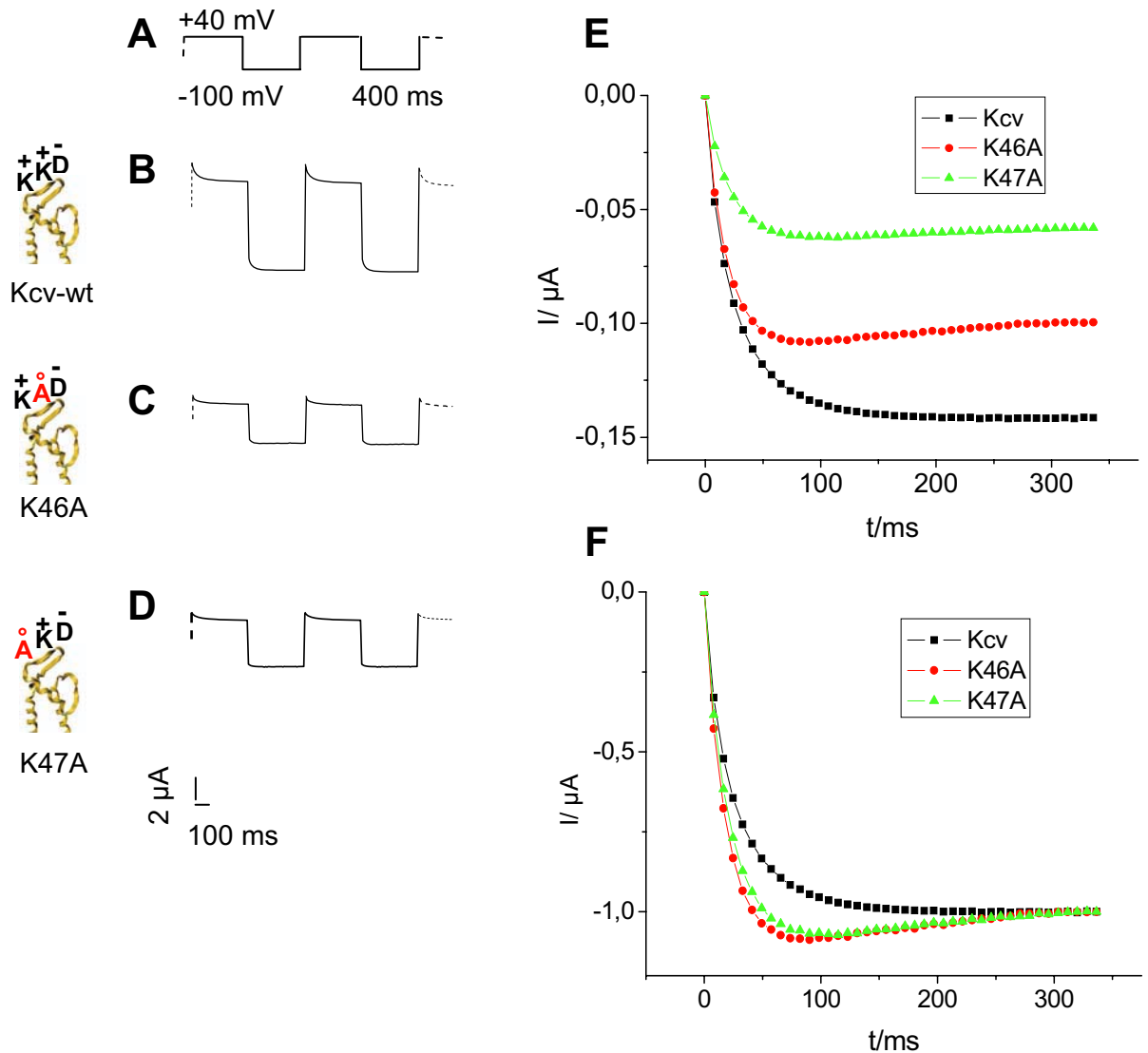


Abb. 3.9: Vergleich der trägen Komponente von Kcv-wt und den Mutanten K46A und K47A

Stromantworten von Kcv-wt und den Mutanten K46A, K47A (B-D) auf 100 aufeinander folgende Spannungspulse von +40 mV auf -100 mV (A). Abb. 3.9/E zeigt die auf 0 normierte und Abb. 3.9/F auf 0 und -1 normierte zeitliche Komponente. Für Kcv-wt fließen $n=3$, für K46A $n=2$ und für K47A $n=3$ Zellen in die Auswertung ein. Am linken Bildrand: Schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Tab. 3.3: Ermittelte Zeitkonstanten für Kcv-wt, K46A und K47A

Die in Abb. 3.9/F gezeigten trägen Komponenten wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) beschrieben und die aufgeführten Zeitkonstanten ermittelt. Hierbei bezeichnet die aktivierende Komponente den trägen spannungsabhängigen Verlauf bei -140 mV und die deaktivierende Komponente den trägen spannungsabhängigen Verlauf bei +40 mV.

	Aktivierende Komponente (-140 mV)		Deaktivierende Komponente (+40 mV)	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Kcv-wt	10,9 ± 0,2 ms	38,05 ± 0,4 ms	20,9 ± 0,6 ms	105,8 ± 3,2 ms
K46A	17,1 ± 0,2 ms	420,5 ± 10,5 ms	16,1 ± 1,0 ms	111,7 ± 3,7 ms
K47A	19,9 ± 0,2 ms	447 ± 21,4 ms	15 ± 0,9 ms	108,8 ± 3,7 ms

Zusammenfassend kann aus den vorhergehenden Analysen geschlossen werden, dass durch die Mutationen K46A und K47A die Kinetik der trägen spannungsabhängigen Komponente von einer langsamen Aktivierung bei Kcv-wt, für die Mutanten K46A und K47A in eine langsame Inaktivierung überführt werden kann.

Zusätzlich wurde auch die träge Kinetik der Tailströme bei +40 mV betrachtet (Abb. 3.9/B-D) und mit Gleichung 1 beschrieben (Tab. 3.3). Hierbei ergaben sich für Kcv-wt (n=2), K46A (n=2) und K47A (n=2) keine signifikanten Abweichungen in der Kinetik.

Neben den kinetischen Untersuchungen wurden auch K⁺ Selektivitäts- und Block-Experimente durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch RNA-Injektion der Mutanten K46A, K47A und K46A/K47A in *Xenopus laevis* Oozyten eine Kcv-wt ähnliche Leitfähigkeit induziert werden konnte. Hierbei zeigten die Mutanten K46A (-17,3 ± 1,7mV; n=4), K47A (-19,2 ± 2,6mV; n=6) und K46A/K47A (-21,4 ± 1,0mV; n=4) gegenüber Kcv-wt (-18,3 ± 1,7mV; n=13) nur eine geringe Abweichung der Umkehrspannung bei 50 mM K⁺ im Außenmedium. Für K46A und K47A konnte außerdem keine Veränderung in der K⁺-Selektivität nachgewiesen werden (Tabelle im Anhang). Zudem vermochte Chloroquine bei K46A (85,2 ± 5,6%; n=16) und K47A (82,2 ± 4,4%; n=11) eine ähnliche Inhibitionsrate hervorzurufen wie bei Kcv-wt (85,8 ± 6%; n=12). Die Doppelmutante K46A/K47A zeigte nur eine niedrige Expressionsrate, und es konnten für definitive Aussagen nicht ausreichend K⁺ Selektivitäts- bzw. Chloroquine-Block-Experimente durchgeführt werden. Die Umkehrspannung bei 50 mM K⁺ suggeriert keine Veränderungen in der K⁺ Selektivität für die Doppelmutante. Die Reaktion auf die Perfusion mit Chloroquine fiel heterogen aus. Im Mittel ergab sich ein prozentualer Stimulus durch Chloroquine von 27 ± 42% (n=3).

Die unterschiedliche Spannungsabhängigkeit von K46A/K47A zeigt sich auch im Verlauf der Tailströme bzw. Aktivierungsströme (Abb. 3.10). Die Aktivierungsströme, die Ströme die direkt nach dem Spannungssprung von einer Konditionierungsspannung auf -80 mV gemessen wurden, wurden als Aktivierungskurven aufgetragen (Abb. 3.10/B, D). Die Aktivierungskurve hat eine charakteristische Form und spiegelt die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit eines Kanals wider. In Abbildung 3.10/A, C sind die Tailströme von Kcv-wt und K46A/K47A gezeigt. Einerseits unterscheiden sich die Tailströme in ihrer Form und andererseits zeigt die Mutante K46A/K47A eine Inversion der Tailstromfolge im Gegensatz zu Kcv-wt. Trägt man die kurz nach dem Spannungssprung auf -80 mV erhaltenen Tailströme als Funktion der Vorspannung auf, so ergeben sich die Aktivierungskurven (Abb. 3.10/B, D). Diese lassen sich mit einer Boltzmann-Funktion beschreiben (Gleichung 2). Die Boltzmann-Funktion beschreibt mit den Parametern dx und x_0 die Spannungsabhängigkeit eines Kanals, die Parameter A1 und A2 beschreiben die maximale bzw. minimale Offenwahrscheinlichkeit (Hille 2001).

$$y = A2 + \frac{(A1 - A2)}{(1 + e^{((x - x_0) / dx)})} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

A1 = maximale Offenwahrscheinlichkeit

A2 = minimale Offenwahrscheinlichkeit

x_0 = Spannung für halbmaximale Aktivierung

dx = reziproker Steigungsfaktor

Wie durch die Aktivierungskurven in Abbildung 3.10 angedeutet, öffnet eine Fraktion der Kcv-wt Kanäle bei hyperpolarisierenden Spannungen (Gazzarini *et al.*, 2002). Im Beispiel der Abbildung 3.9/B und D betrug die halbmaximale Aktivierungs-Spannung (x_0) für Kcv-wt $-82,9 \pm 2,2$ mV und der reziproke Steigungsfaktor (dx) lag bei $+31,9 \pm 2,9$ mV (mittel \pm SD; $x_0 = -81,6 \pm 10$ mV, $dx = 37,1 \pm 7,1$ mV; $n=4$). Im Gegensatz hierzu schließt eine Fraktion der K46A/K47A Kanäle bei hyperpolarisierenden Spannungen. Dies reflektiert sich in den Fitparametern für K46A/K47A: Die Werte für x_0 lagen bei $+55,3 \pm 7,7$ mV und für dx bei $-24,6 \pm 2$ mV (mittel \pm SD; $x_0 = 59,9 \pm 9,2$ mV, $dx = -25,2 \pm 5,7$ mV; $n=4$). Der Vergleich des Referenzkanals Kcv-wt und der Mutante K46A/K47A mit den Parametern der Boltzmann-Funktion reflektiert die in Abb. 3.10/B und D zu beobachtende Invertierung der Spannungsabhängigkeit.

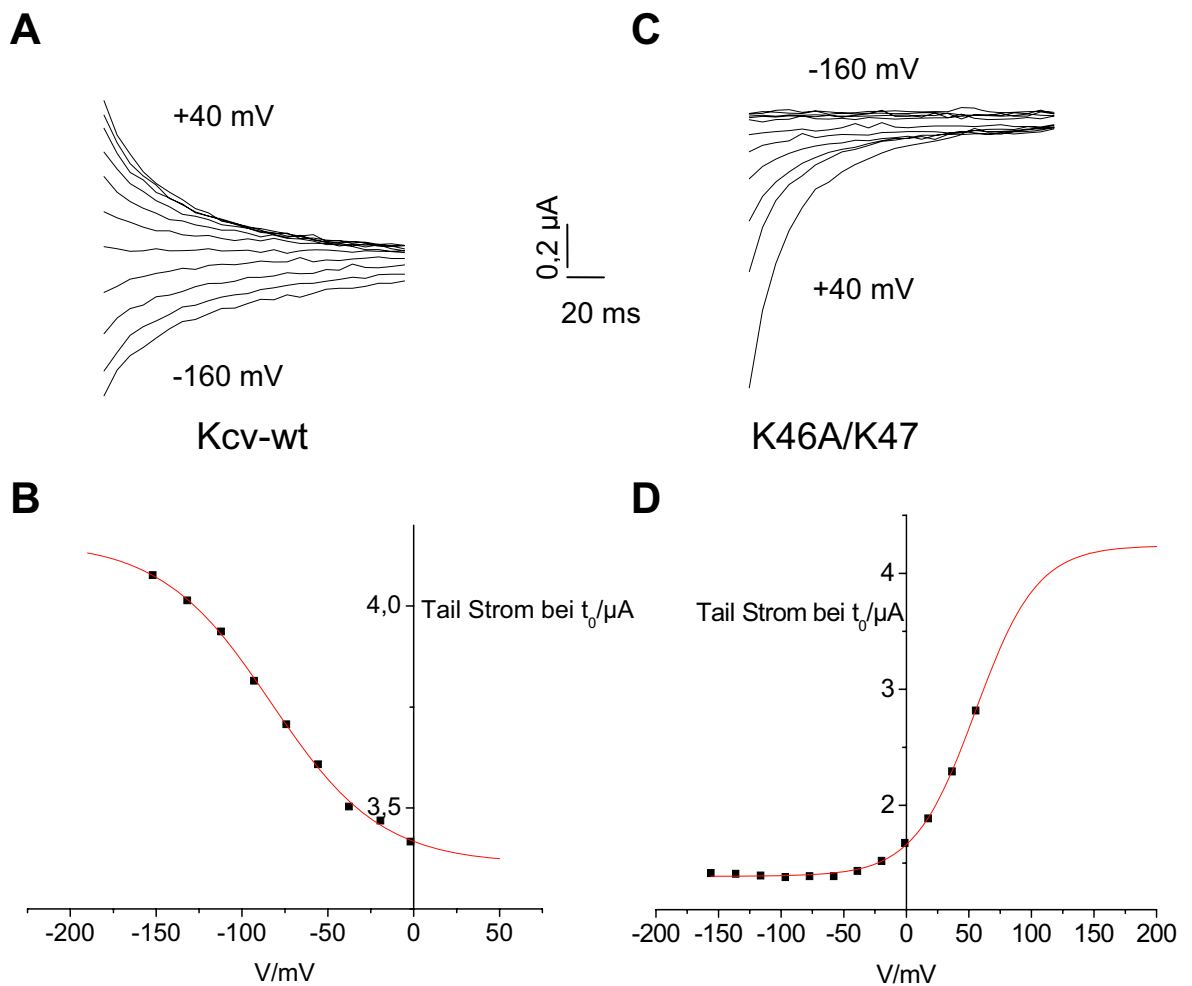


Abb. 3.10: Tailströme von Kcv-wt und der Doppelmutante K46A/K47A zeigen eine unterschiedliche spannungsabhängige Kinetik

Vergrößerung der Tailströme von Kcv-wt (A) und K46A/K47A (C) aus Abb.3.1/C bzw. Abb. 3.7/D. Die Tailströme wurden bei -80 mV aufgezeichnet nachdem zuvor auf die verschiedenen Konditionierungsspannungen (+40 mV bis -160 mV) geklemmt wurde. Beide zeigen eine unterschiedliche Relaxations-Kinetik (A, C), wobei sich für K46A/K47A im Gegensatz zu Kcv-wt eine umgekehrte Spannungsabhängigkeit ergibt. Die roten Graphen in B und D sind das Ergebnis des Boltzmann-Fits (Gleichung 2). Der Wert für die halbmaximale Aktivierungs-Spannung (x_0) ergab für Kcv-wt $-82,9 \pm 2,2$ mV und für K46A/K47A $+55,3 \pm 7,7$ mV. Der reziproke Steigungsfaktor der Funktion (dx) wurde mit $+31,9 \pm 2,9$ für Kcv-wt und mit $-24,6 \pm 2$ für K46A/K47A berechnet.

Die Ergebnisse der Aktivierungskurven von K46A und K47A, aber auch der anderen in der *Turret*-Domäne lokalisierten bzw. mutierten Ladungen werden in Abschnitt 3.2.7 behandelt.

Die vorliegenden Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen: Die Mutanten K46A und K47A zeigen nur geringe Unterschiede zu Kcv-wt im Phänotyp der Stromantwort, K46A/K47A hingegen einen aktivierenden Auswärtsstrom und eine Veränderung der zeitlichen Komponente (Abb. 3.7). K46A/K47A zeigt zusätzlich eine Veränderung der Tailströme, die auf eine Inversion der Spannungsabhängigkeit und der Offenwahrscheinlichkeit hinweisen (Abb. 3.10).

Durch die Applikation von 100 Pulsen konnten minimale Unterschiede im zeitlichen Verlauf der trägen Komponente von K46A und K47A festgestellt werden (Abb. 3.9). Die Mutanten K46A und K47A können mit Chloroquine mit ähnlicher Inhibitionsrate wie Kcv-wt geblockt werden und bleiben K^+ -selektiv, wobei zu K46A/K47A noch weitere Messungen als Bestätigung der Kaliumselektivität und zur Aufklärung des heterogenen Chloroquine-Blocks benötigt werden.

3.2.2 Vergleich zwischen Kcv-wt und den Mutanten K46R und K47R

Bei den in Abschnitt 3.2.1 vorgestellten Mutanten K46A und K47A wurde die potentiell positiv geladene Aminosäure Lysin durch Alanin neutralisiert. Bei den folgenden Mutanten K46R und K47R wurde an gleicher Position die basische und polare Aminosäure Lysin gegen die ebenfalls basische und polare Aminosäure Arginin ausgetauscht. Durch diesen Austausch bleibt die potentielle Ladung erhalten. Durch die Guanidin Gruppe des Arginins verlängert sich die Seitenkette im Gegensatz zum ursprünglichen Lysin. Dies könnte durch die beiden zusätzlichen Aminogruppen innerhalb des Arginins auch zu sterischen Effekten führen.

In Abbildung 3.11/ B, C sind die Stromantworten der Mutanten auf ein Standardpulsprotokoll (Abb.3.11/A) dargestellt. Die Mutanten K46R und K47R zeigen ähnliche phänotypische Merkmale wie Kcv-wt, d.h. einen hohen instantanen Strom, der bei extrem negativen Spannungen reduziert wird und eine aufgelagerte träge Komponente bei negativen Spannungen.

Die Mutante K46R zeigt wie Kcv-wt eine träge Aktivierung bei extrem negativen Spannungen (-140 mV bis -160 mV). Dieser anfänglichen trägen Aktivierung folgt eine langsame Inaktivierung (Abb.3.11/B). Der Vergleich der Einzelspuren (-140 mV) zeigt deutlich, dass K46R zuerst schnell aktiviert, bevor der Strom dann inaktiviert (Abb.3.11/D). K47R hingegen aktiviert in der ersten Phase schnell und in der zweiten Phase langsam. Diese phänotypischen Merkmale haben keinen entscheidenden Effekt auf den Vergleich der gemittelten Strom-Spannungs-Beziehungen (Abb. 3.11/E). Kcv-wt (n=8) und K46R (n=6) verlaufen im stationären Strom nahezu identisch. Die Mutante K47R (n=6) zeigt bei Spannungen negativer als -100 mV eine Reduktion des *steady state* Stroms, weicht aber nur minimal von dem Verlauf von Kcv-wt ab. Außerdem fällt bei den Mutanten K46R und K47R (Abb.3.11/B-C) auf, dass sich die Größe der Stromamplituden deutlich von Kcv-wt (Abb.3.1/C, 3.2/B, 3.3/B und 3.4/B) unterscheiden (Tab. 3.2, Abb. 3.7a). Beim Betrachten der Stromamplituden ergibt sich folgendes Bild: Kcv-wt $6,8 \pm 3,3 \mu\text{A}$ (n=11), K46R $2,5 \pm 0,8 \mu\text{A}$ (n=6) und K47R $1,8 \pm 0,4 \mu\text{A}$ (n=3).

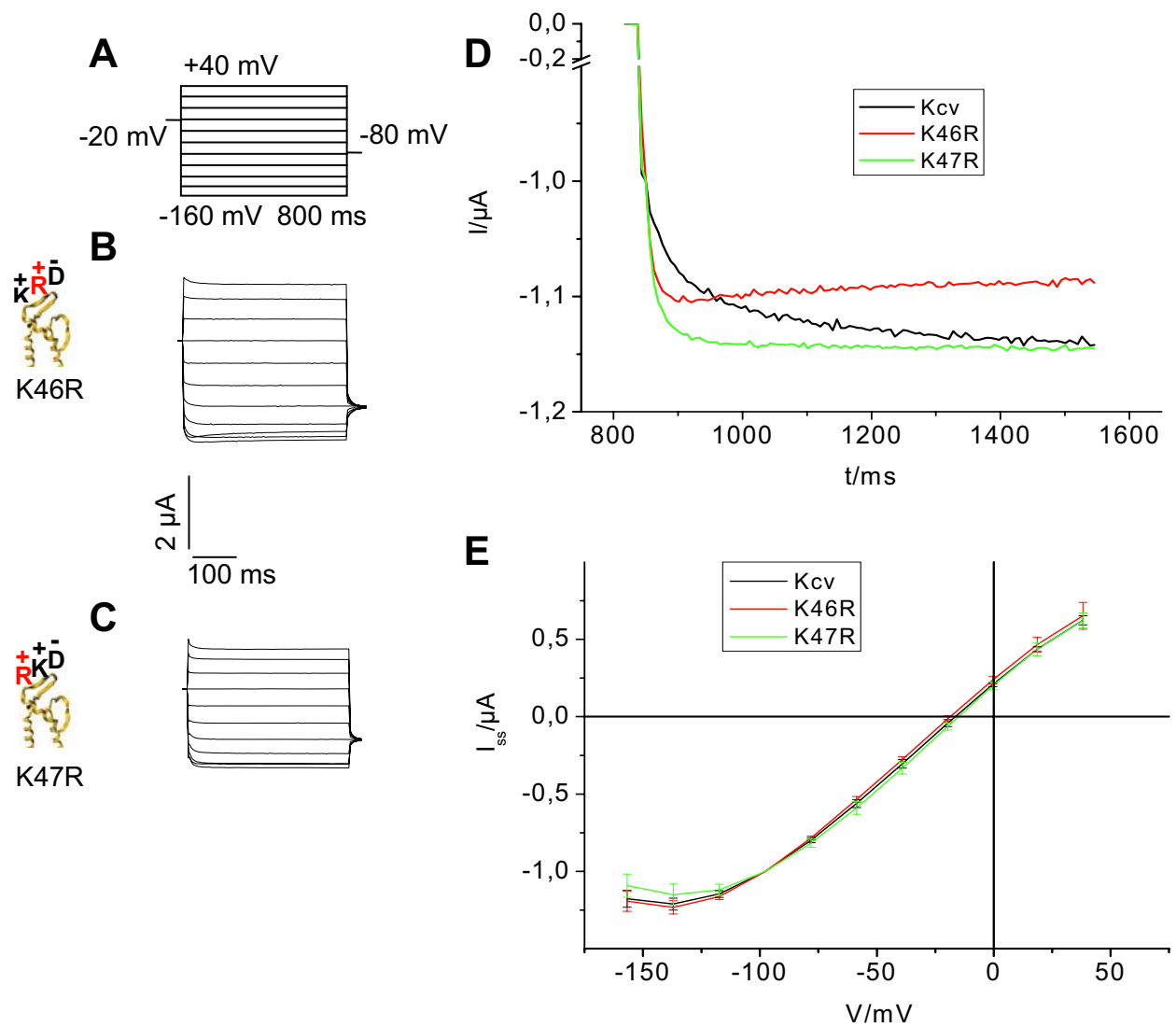


Abb. 3.11: Heterologe Expression der Kcv-Mutanten K46R und K47R in *Xenopus* Oozyten

Stromantworten der Mutanten K46R und K47R (B, C) auf Spannungspulse von +40 mV bis -160 mV (A). Einzelspurvergleich bei -140 mV mit auf -1 normiertem instantanem Strom (E). (F) Vergleich der auf -100 mV normierten Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt (n=8) mit K46R (n=6) und K47R (n=3). Am linken Bildrand: schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Wie in Abbildung 3.9 wurden auch bei den Mutanten K46R und K47R 100 Pulse appliziert, um einen besseren Einblick in die träge spannungsabhängige Stromkomponente der Mutanten zu erhalten (Abb.3.12). In Abbildung 3.12/E wurde die träge Stromkomponente auf Null normiert. Der Graph für K47R ($n=2$) verläuft in Form und Größe ähnlich zur Stromantwort von Kcv-wt ($n=3$). K46R dagegen zeigt eine niedrigere Stromamplitude und wie in Abbildung 3.11 beschrieben, eine Inaktivierung im Verlauf der Messungen. Dieser Unterschied von K46R in Bezug zu K47R und Kcv-wt wird noch deutlicher in Abbildung 3.12/E, in der die Messungen auf eine gemeinsame Ordinate ($t_0=0$; $t_{340}=-1$) normiert sind. Wie bei den Mutanten K46A und K47A wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) zwei Zeitkonstanten ermittelt. Diese sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die erste Zeitkonstante (τ_1) liegt bei den beiden Mutanten und Kcv-wt dicht beieinander, wobei K46R ($18,9 \pm 0,3$ ms) etwas mehr von Kcv-wt ($10,9 \pm 0,2$ ms) und K47R ($12,9 \pm 0,4$ ms) abweicht. Die zweite Zeitkonstante (τ_2) beschreibt den weiteren Verlauf der Leitfähigkeit; auch hier stimmen Kcv-wt ($38,05 \pm 0,4$ ms) und K47R ($40,3 \pm 1$ ms) gut überein. Bei K46R wird die langsame zeitliche Inaktivierung durch eine hohe Zeitkonstante ($570 \pm 20,6$ ms) bestätigt.

Zusätzlich wurde auch die Kinetik der Tailströme bei +40 mV betrachtet und mit Gleichung 1 beschrieben. Hierbei ergaben sich für Kcv-wt ($n=2$) und K46R ($n=2$) nur geringe Abweichungen in der Kinetik. Die Zeitkonstanten für K47R ($n=2$) ergaben die höchsten Abweichungen aller Mutanten von Kcv-wt, geben allerdings keinen signifikanten Hinweis auf eine nachhaltige Änderung in der Kinetik.

Tab. 3.4: Ermittelte Zeitkonstanten für Kcv, K46R und K47R

Die in Abb.3.12 gezeigten zeitlichen Komponenten wurden mit der doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) beschrieben und die aufgeführten Zeitkonstanten ermittelt. Hierbei bezeichnet die aktivierende Komponente den trägen spannungsabhängigen Verlauf bei -140 mV und die deaktivierende Komponente den trägen spannungsabhängigen Verlauf bei +40 mV.

	Aktivierende Komponente (-140 mV)		Deaktivierende Komponente (+40 mV)	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Kcv-wt	$10,9 \pm 0,2$ ms	$38,05 \pm 0,4$ ms	$20,9 \pm 0,6$ ms	$105,8 \pm 3,2$ ms
K46R	$18,9 \pm 0,3$ ms	$570 \pm 20,6$ ms	$17,8 \pm 0,5$ ms	$99,6 \pm 4$ ms
K47R	$12,9 \pm 0,4$ ms	$40,3 \pm 1$ ms	$32,8 \pm 2,2$ ms	$157,3 \pm 7,8$ ms

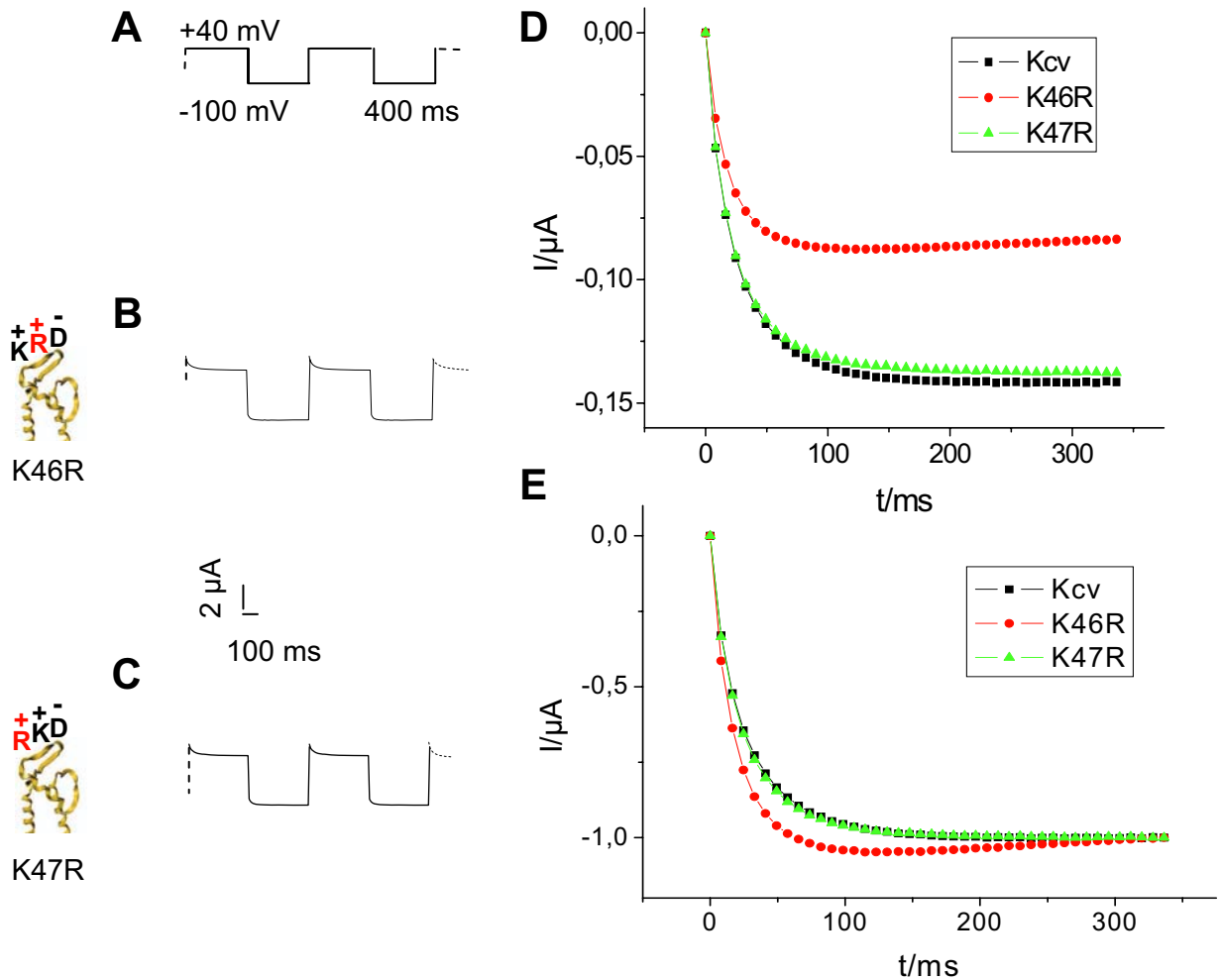


Abb. 3.12: Vergleich der zeitlichen Komponente von Kcv-wt und den Mutanten K46R und K47R

Stromantworten von der Mutanten K46R und K47R (B, C) auf 100 aufeinander folgende Spannungspulse von +40 mV auf -100 mV (A). Abb.3.12/D zeigt die auf 0 normierte und Abb.3.12/E auf 0 und -1 normierte zeitliche Komponente. Für Kcv-wt fließen $n=3$, für K46R $n=4$ und für K47R $n=2$ Zellen in die Auswertung ein. Am linken Bildrand: schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Neben den kinetischen Eigenschaften wurden auch K^+ -Selektivität und die Reaktion der Mutanten auf Chloroquine untersucht. Wie in Abbildung 3.11 beschrieben, wurde durch RNA Injektion der Mutanten K46R und K47R in *Xenopus laevis* Oozyten eine Kcv-wt ähnliche Leitfähigkeit induziert. Die Umkehrspannung bei 50 mM K^+ erfuhr weder für K46R ($-20,3 \pm 3,4/n=8$) noch für K47R ($-16,2 \pm 1,6/n=3$) eine signifikante Verschiebung im Gegensatz zu Kcv-wt ($-18,3 \pm 1,7/n=13$). Außerdem bleibt bei der Mutante K46R die K^+ Selektivität erhalten (Tabelle im Anhang). Für Aussagen über die K^+ Selektivität von K47R stehen Messungen mit verschiedenen K^+ Konzentrationen noch aus.

Chloroquine vermochte bei K46R ($79,37 \pm 3,71\% / n=2$) und K47R ($71,47 \pm 2,47\% / n=2$) eine ähnliche Inhibitionsrate hervorzurufen wie bei Kcv-wt ($85,83 \pm 5,97\% / n=12$).

Insgesamt geht aus den Daten hervor, dass zwischen den Mutanten K46R und K47R nur minimale Unterschiede bestehen. Die Mutante K46R zeigt innerhalb der zeitlichen Komponente, im Gegensatz zu Kcv-wt, eine Inaktivierung in der zweiten Phase der Stromantwort (Abb.3.11/B, D). Diese Beobachtung wird durch die weitere Analyse der trägen spannungsabhängigen Komponente in Abbildung 3.12 bestätigt. K47R zeigt innerhalb der trägen spannungsabhängigen Komponente einen ähnlichen Verlauf zu Kcv-wt. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Mutation an der vermutlich weiter von der Pore entfernt liegenden Position 47 (Abb.3.5) eine geringere Auswirkung hat als die an Position 46. Da die potentielle Ladung durch Arginin erhalten bleiben sollte, könnten sterische Effekte und die daraus resultierende veränderte K^+ Koordinierung, d.h. K^+ könnte in veränderter Konzentration um die Pore vorliegen, den Ausschlag geben.

K46R zeigt keine Veränderung in der K^+ Selektivität (Tabelle im Anhang). Für K47R stehen noch Selektivitätsversuche aus, doch weist die unveränderte Umkehrspannung bei 50 mM K^+ auf eine Beibehaltung der K^+ -Selektivität auch bei K47R hin. Beide Mutanten lassen sich durch Chloroquine inhibieren.

3.2.3 Vergleich zwischen Kcv-wt und der Mutante D45N

Bei der Mutante D45N wurde die azide Aminosäure Aspartat an Position 45 durch Asparagin, das ungeladene Amid von Aspartat, ersetzt. Beide Aminosäuren besitzen polare Seitenketten und unterscheiden sich sterisch sowie in ihrer Masse nur geringfügig voneinander. Die im Protein potentiell durch Aspartat negativ geladene Position 45 sollte ohne nennenswerten sterischen Effekt neutralisiert werden.

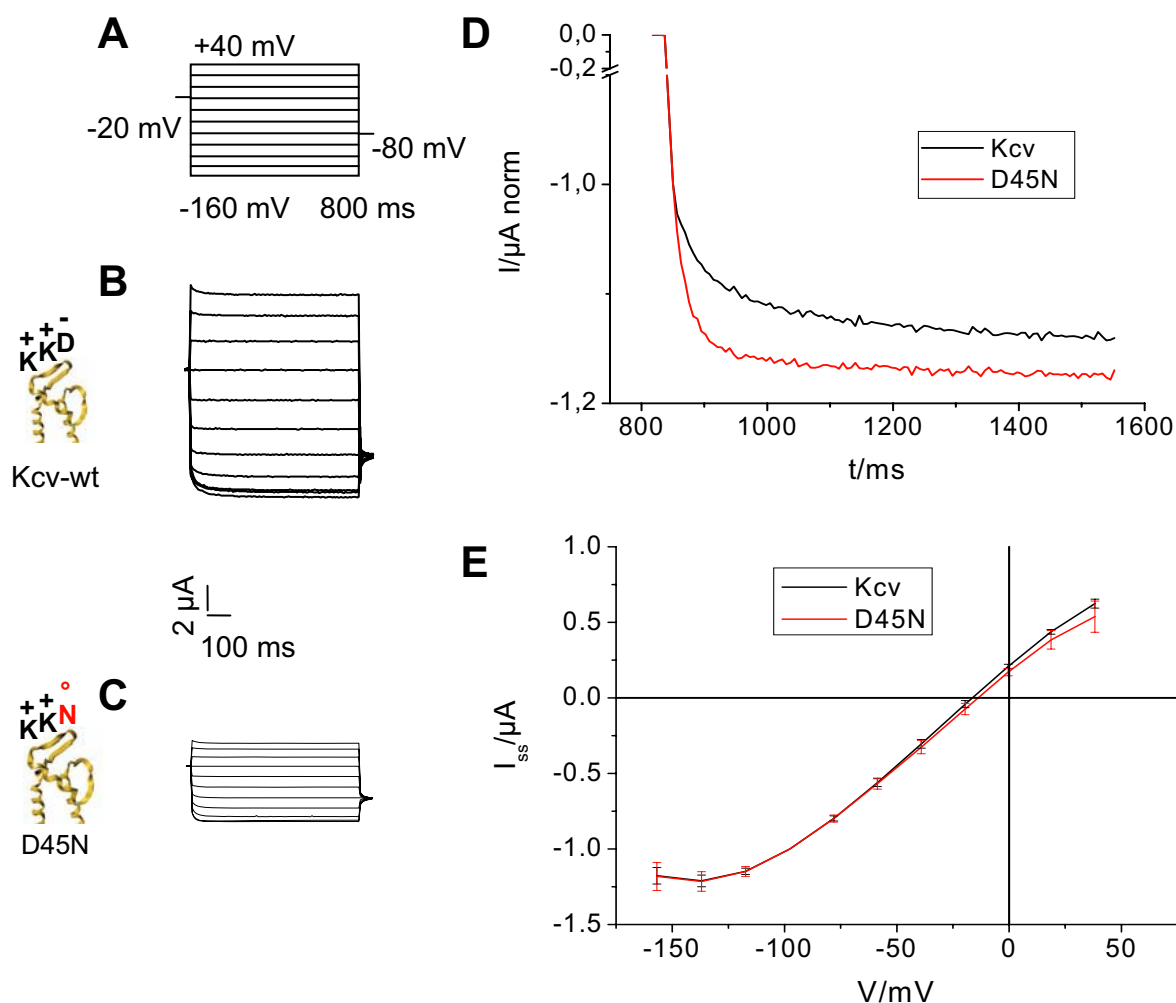


Abb. 3.13: Heterologe Expression der Kcv-Mutanten D45N in *Xenopus* Oozyten

Stromantworten von Kcv-wt und D45N (B-C) auf ein Standardpulsprotokoll (A). Einzelspurvergleich bei -140 mV mit auf Eins normiertem instantanem Strom (D). (E) Vergleich der auf -100 mV normierten Strom-Spannungsbeziehung von Kcv-wt (n=8) und D45N (n=9). Am linken Bildrand: schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Die Stromantwort von D45N zeigt nach Applikation eines Standardpulsprotokolls im Vergleich zu Kcv-wt keine Unterschiede im Phänotyp. Die gemittelte und auf -100 mV normierte Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt (n=8) und D45N (n=9) zeigt ebenfalls einen nahezu identischen Verlauf (Abb.3.13/E). Nur die Stromamplitude scheint sich bei der Mutante D45N zu verringern (Abb.3.13/A-C). Ein Vergleich der Mittelwerte der Stromantwort bei -140 mV von Kcv-wt ($-6,8 \pm 3,6 \mu\text{A}$; n=11) und D45N ($-2,0 \pm 0,9 \mu\text{A}$; n=9) erlauben diese Vermutung.

Der Vergleich der Einzelspuren aus Abb.3.13/D zeigt bei D45N eine schnellere zeitliche Aktivierung und im Gegensatz zu Kcv-wt keine kontinuierliche Aktivierung im weiteren Verlauf der Stromantwort. Abbildung 3.14 zeigt die Analyse von 100 aufeinander folgenden Pulsen. In Abbildung 3.14/C ist eine Stromantwort von D45N auf einen Spannungspuls (Abb.3.14/A) gezeigt. Die auf Null normierte träge Komponente (Abb.3.14/D) zeigt einen ähnlichen Verlauf von Kcv-wt (n=3) und D45N (n=2).

Bei den auf eine gemeinsame Ordinate ($t_0=0$; $t_{340}=-1$) normierten Datensätze (Abb.3.14/E) ist zwischen beiden Kurven kaum ein Unterschied festzustellen. Diese nahezu identische Kinetik spiegelt sich auch in den ermittelten Zeitkonstanten wider (Tab. 3.5). Die erste, durch eine doppelte Exponentialfunktion (Gleichung 2) ermittelte Zeitkonstante (τ_1) zeigt keine großen Abweichungen zwischen Kcv-wt ($10,9 \pm 0,2 \text{ ms}$) und D45N ($14,3 \pm 0,4 \text{ ms}$) auf. Die zweite Zeitkonstante (τ_2) ergibt zwischen Kcv-wt ($38,05 \pm 0,4 \text{ ms}$) und D45N ($49 \pm 1,7 \text{ ms}$) eine geringe Abweichung von ca. 10 ms.

Beschreibt man die Kinetik des Tailpulses bei +40 mV mit Gleichung 1, ergibt sich für Kcv-wt (n=2) und D45N (n=2) kein relevanter Unterschied (Tab. 3.5).

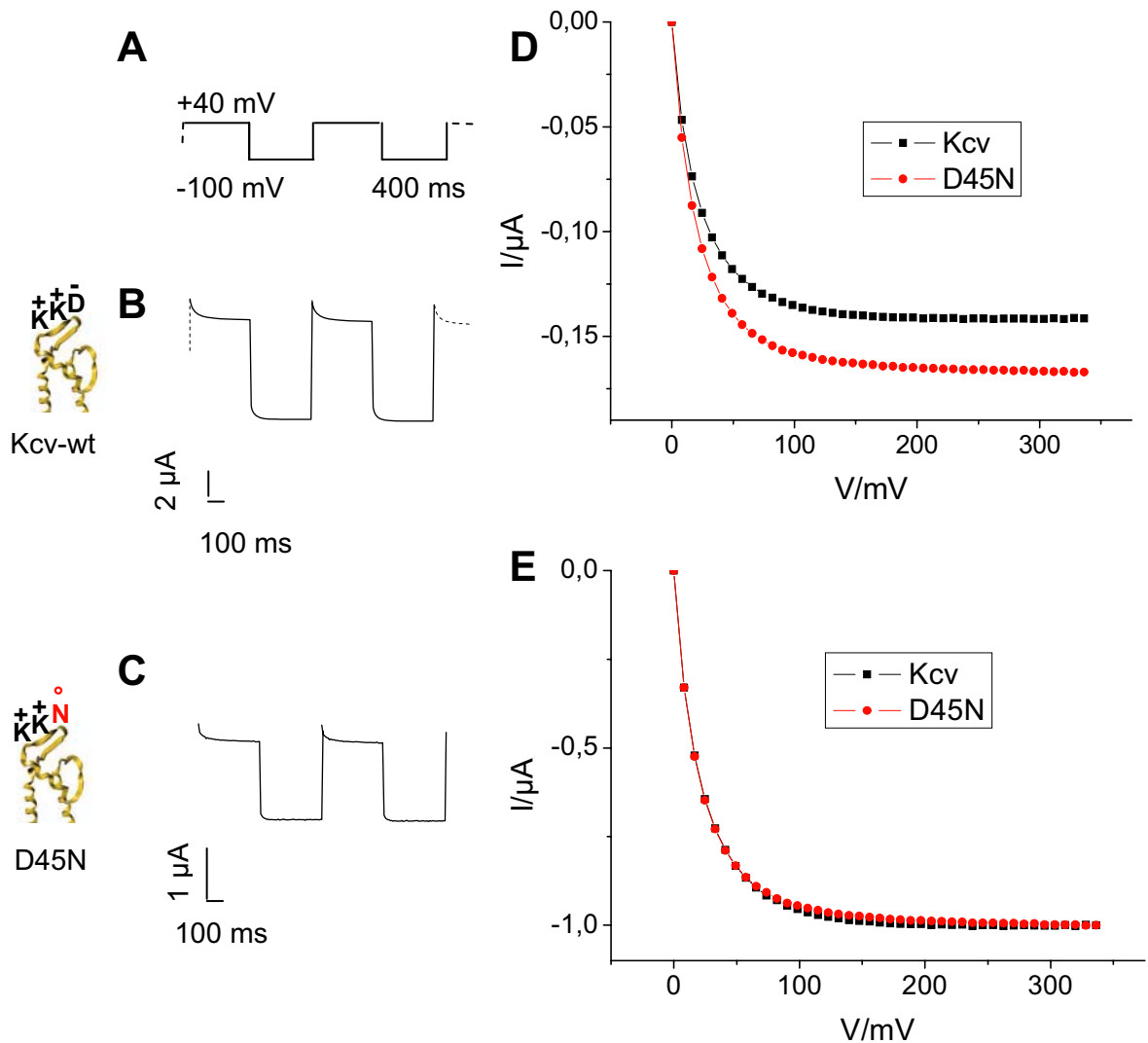


Abb. 3.14: Vergleich der zeitlichen Komponente von Kcv-wt und der Mutante D45N

Stromantworten von Kcv-wt und der Mutante D45N (B-C) auf 100 aufeinander folgende Spannungspulse von +40 mV auf -100 mV (A). Abb.3.14/D zeigt die auf Null normierte und Abb.3.14/E auf Null und Eins normierte zeitliche Komponente. Für Kcv-wt fließen $n=3$ und für D45N $n=2$ Zellen in die Auswertung ein. Am linken Bildrand: schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Tab. 3.5: Ermittelte Zeitkonstanten für Kcv-wt und D45N

Die in Abb.3.14 gezeigten zeitlichen Komponenten wurden mit der doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) beschrieben und die dargestellten Zeitkonstanten ermittelt.

	Aktivierende Komponente (-140 mV)		Deaktivierende Komponente (+40 mV)	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Kcv-wt	10,9 ± 0,2 ms	38,1 ± 0,4 ms	20,9 ± 0,6 ms	105,8 ± 3,2 ms
D45N	14,3 ± 0,4 ms	49 ± 1,7 ms	17,8 ± 0,5 ms	132,4 ± 4,7 ms

Neben den kinetischen Eigenschaften wurden auch K^+ Selektivität und der Effekt von Chloroquine, Barium und NMG^+ untersucht. Die Mutante D45N zeigt mit Kcv-wt vergleichbare Umkehrspannungen für 50 mM, 20 mM und 100 mM K^+ und folglich eine ähnliche K^+ Selektivität wie Kcv-wt (Tabelle im Anhang). Zudem verschiebt 50 mM Rb^+ das bei 50 mM K^+ ermittelte Umkehrpotential von D45N um $2,65 \pm 0,25$ mV ($n=2$) und das von Kcv-wt um $1,26 \pm 1,06$ mV ($n=6$) zu positiveren Spannungen. Dies lässt auf eine gleich bleibend erhöhte Permeabilität von Rubidium über Kalium schließen.

Die prozentuale Inhibition durch 300 μ M Chloroquine von D45N liegt bei $79,1 \pm 7\%$ ($n=4$) und befindet sich im Bereich der Hemmung von Kcv-wt ($85,8 \pm 6\%$; $n=12$). Das gleich gilt für die Hemmung durch Barium, Kcv-wt ($92,0 \pm 5\%$; $n=7$) und D45N ($90,0 \pm 5,7\%$; $n=3$). N-methyl-D-Glukamin (NMG^+) zeigt bei der Mutante D45N einen heterogenen Effekt. Die gemittelte Hemmung lag bei $11,6 \pm 18,6 \%$ ($n=4$) im Gegensatz zu Kcv-wt ($18,34 \pm 1,73\%$; $n=13$). Die veränderte Inhibition durch NMG^+ könnte auf veränderte Nettoladung der Oberfläche und damit auf veränderte Bindungseigenschaften mit NMG^+ zurückzuführen sein.

Die Mutante D45N weist keine Unterschiede in den phänotypischen Eigenschaften der Stromantwort, in der Kaliumselektivität und in der Barium- und Chloroquine-Inhibierungsrate in Bezug zu Kcv-wt auf. Einzig eine leicht veränderte Reaktion auf NMG^+ ist zu beobachten. Außerdem weisen die Daten drauf hin, dass sich die Stromamplitude von D45N verringert.

3.2.4 Vergleich zwischen Kcv und der Mutante D45E

Während bei der Mutante D45N die potentiell negative Ladung neutralisiert wurde, bleibt bei der Mutation D45E die negative Ladung erhalten, indem die azide Aminosäure Aspartat an Position 45 durch die ebenfalls azide Aminosäure Glutamat ersetzt wurde. Die jeweiligen Aminosäuren unterscheiden sich nur geringfügig in der Masse, was durch eine zusätzliche Methylgruppe in der Seitenkette des Glutamats hervorgerufen wird.

Die Mutante hatte nur eine niedrige Expressionsrate, wodurch nur wenige erfolgreiche Experimente durchgeführt werden konnten. Abbildung 3.15/B-C zeigt Stromantworten von D45E auf ein Standardpulsprotokoll (Abb.3.15/A). Bei 50 mM K^+ im Außenmedium (Abb.3.15/B) zeigt die Mutante einen biphasischen Verlauf wobei die Stromantworten bei -140 mV und -160 mV in der ersten Phase aktivieren und in der zweiten Phase inaktivieren. Wird das Bad mit 100 mM K^+ perfundiert, stellt sich eine der Kcv-wt ähnlich Stromantwort ein (Abb.3.15/C). Beide Stromantworten zeigen im Vergleich zu Kcv-wt nur eine geringe Stromamplitude. Der Vergleich bei -140 mV (Abb.3.15/D) veranschaulicht den Unterschied zwischen 50 mM K^+ und 100 mM K^+ . Bei 50 mM K^+ ist die zeitliche Inaktivierung zu erkennen, die sich durch 100 mM K^+ in eine zeitliche Aktivierung überführen lässt. Diese Beobachtung scheint ein systematischer Effekt der Mutation zu sein, da alle Messungen den gleichen Wandel in der Kinetik zwischen 50 mM K^+ und 100 mM K^+ aufweisen (n=4). In Abbildung 3.15/E sind die auf -100 mV normierten Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt (n=8) und D45E (n=6) bei 50 mM K^+ aufgetragen. Bei -160 mV zeigt die Mutante D45E eine geringere Inaktivierung als Kcv-wt bei -160 mV. Allerdings ist der Fehlerbalken für D45E bei -160 mV groß und zeigt für die Mutante eine erhöhte Varianz an.

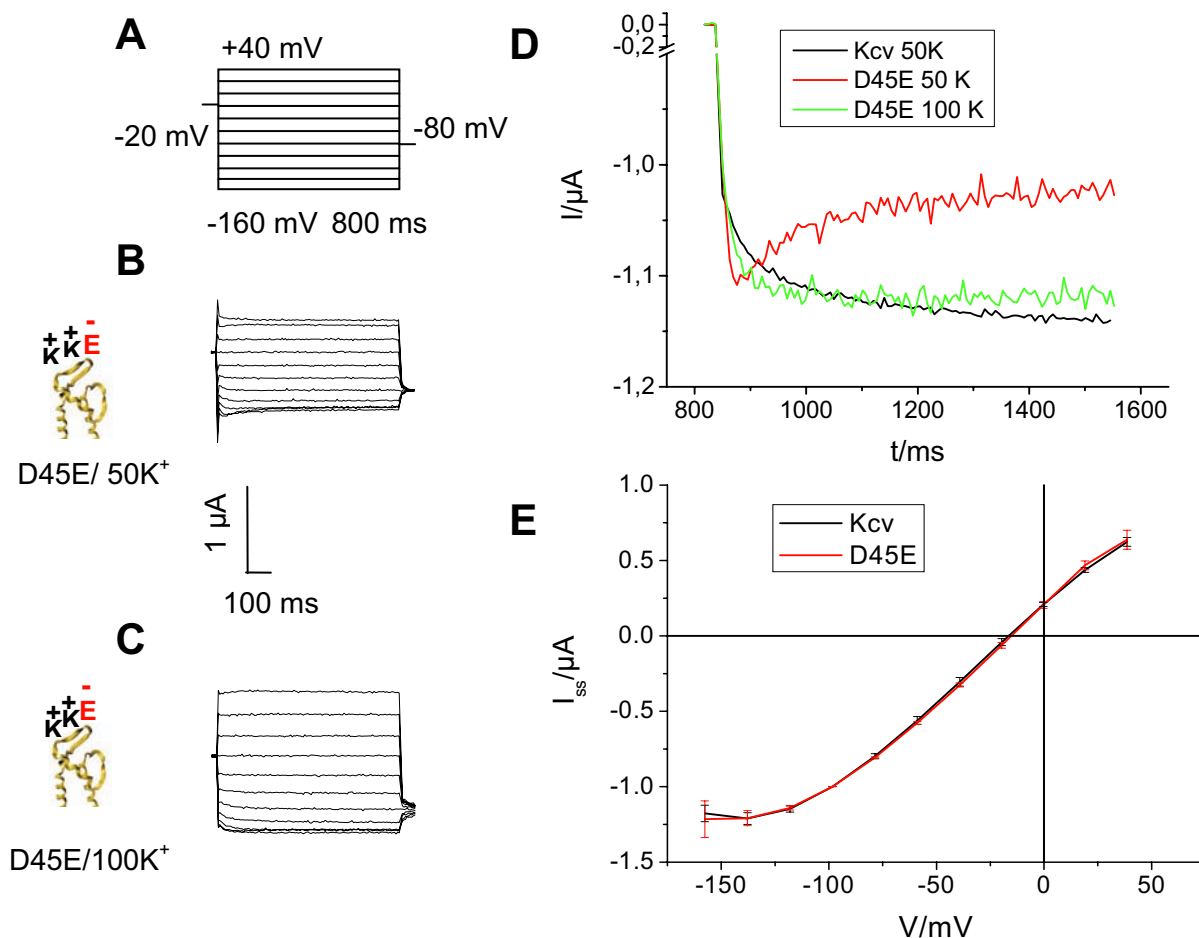


Abb. 3.15: Heterologe Expression der Kcv-Mutante D45E in *Xenopus* Oozyten

Stromantworten der Mutante D45E bei 50 mM K^+ (B) und 100 mM K^+ (C) im Außenmedium auf ein Standardpulsprotokoll (A). Einzelspurvergleich der Stromantworten mit 50 mM K^+ bzw. 100 mM K^+ im Außenmedium bei -140 mV und mit auf -1 normiertem instantanem Strom (D). Vergleich der auf -100 mV normierten Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt ($n=8$) mit D45E ($n=6$) bei 50 mM K^+ (E). Am linken Bildrand: schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

Die Messungen ergaben, dass die Mutante D45E wie Kcv-wt Kalium selektiv ist (Tabelle im Anhang) und auf Barium und Chloroquine reagiert. Die Blockexperimente konnten nur an Zellen mit einer sehr niedrigen Stromantwort durchgeführt werden, was sie für eine vergleichende Analyse untauglich macht.

Trotz der geringen Stromamplitude deuten die gezeigten Daten nicht auf ein unterschiedliches Verhalten der Mutante D45E im Gegensatz zu Kcv-wt in Bezug auf K^+ -Selektivität, Strom-Spannungs-Beziehung (I_{ss}) oder Inhibierung durch blockierende Moleküle hin. Durchaus unterschiedlich ist aber die Kinetik der Stromantwort bei negativen Spannungen, wenn ein Lösungsaustausch von 50 auf 100 mM K^+ vorgenommen wird.

3.2.5 Vergleich zwischen Kcv und der Mutante D68N

Das Aspartat an Position 68 schließt sich an das Rückgrat des Selektivitätsfilters an und bildet so einen Ring aus negativen Ladungen um den Poreneingang (Abb.3.5). Diese negative Ladung ist in vielen Kaliumkanälen konserviert und könnte die Leitfähigkeit entscheidend beeinflussen und somit eine Schlüsselstelle für die Funktion des Kanals sein.

Bei der Mutante D68N wurde die azide Aminosäure Aspartat an Position 68 durch Asparagin, dem ungeladene Amid von Aspartat, ersetzt. Beide Aminosäuren besitzen polare Seitenketten und unterscheiden sich sterisch sowie in ihrer Masse nur geringfügig voneinander. Der Austausch sollte eine Neutralisation der Ladung an der Position 68 herbeiführen und nur einen minimalen sterischen Effekt mit sich bringen.

Der Vergleich zwischen D68N und Kcv-wt in Abbildung 3.16 zeigt für die Mutante eine Stromantwort mit veränderten Eigenschaften. Der instantane Strom und der *steady state* Strom verläuft bei D68N fast linear (Abb.3.16/C). Bei positiven Spannungen ist der Strom pro Spannungspuls ein wenig größer als bei negativen Spannungen. Dies verursacht eine abgeschwächte Rektifizierung im Gegensatz zu Kcv-wt und resultiert in einem fast linearen Verlauf der Strom-Spannungs-Beziehung (Iss) (Abb.3.16/E). Das bedeutet auch, dass die Reduktion des instantanen Stroms bei negativen Spannungen, wie bei Kcv-wt beschrieben, bei der Mutante D68N abhanden kommt. Auffällig ist auch die Änderung in der trägen Komponente. Bei D68N ist eine deutliche Inaktivierung im Verlauf der Stromantwort zu erkennen (Abb.3.16/C). Im Gegensatz dazu zeigt Kcv-wt eine zeitliche Aktivierung (Abb.3.16/B und Abb.3.1). Der Einzelspurvergleich bei -140 mV hebt diesen unterschiedlichen Verlauf noch einmal hervor (Abb.3.16/D).

Neben dem veränderten Phänotyp von D68N unterscheidet sich die Mutante von Kcv-wt auch in der Kaliumselektivität und in der Reaktion auf verschiedene Inhibitoren. Die Selektivität der Kcv-wt bzw. D68N vermittelten Leitfähigkeit wurde über die Ermittlung der Umkehrspannungen bei 20, 50 und 100 mM K^+ festgestellt (Tabelle im Anhang). Die Reduktion der extrazellulären K^+ Konzentration verursachte eine Verschiebung der Umkehrspannung zu negativen Werten. In Abbildung 3.17 sind die jeweiligen Umkehrspannungen gegen den dekadischen Logarithmus der extrazellulären K^+ Konzentration aufgetragen. Die angelegte lineare Regression ergibt für Kcv-wt eine Steigung von ca. 63 mV pro Dekade und damit eine starke K^+ Selektivität (Plugge *et al.*, 2000). Für die Mutante D68N ergibt sich eine Steigung von ca. 28 mV pro Dekade und somit eine Verringerung der K^+ Selektivität.

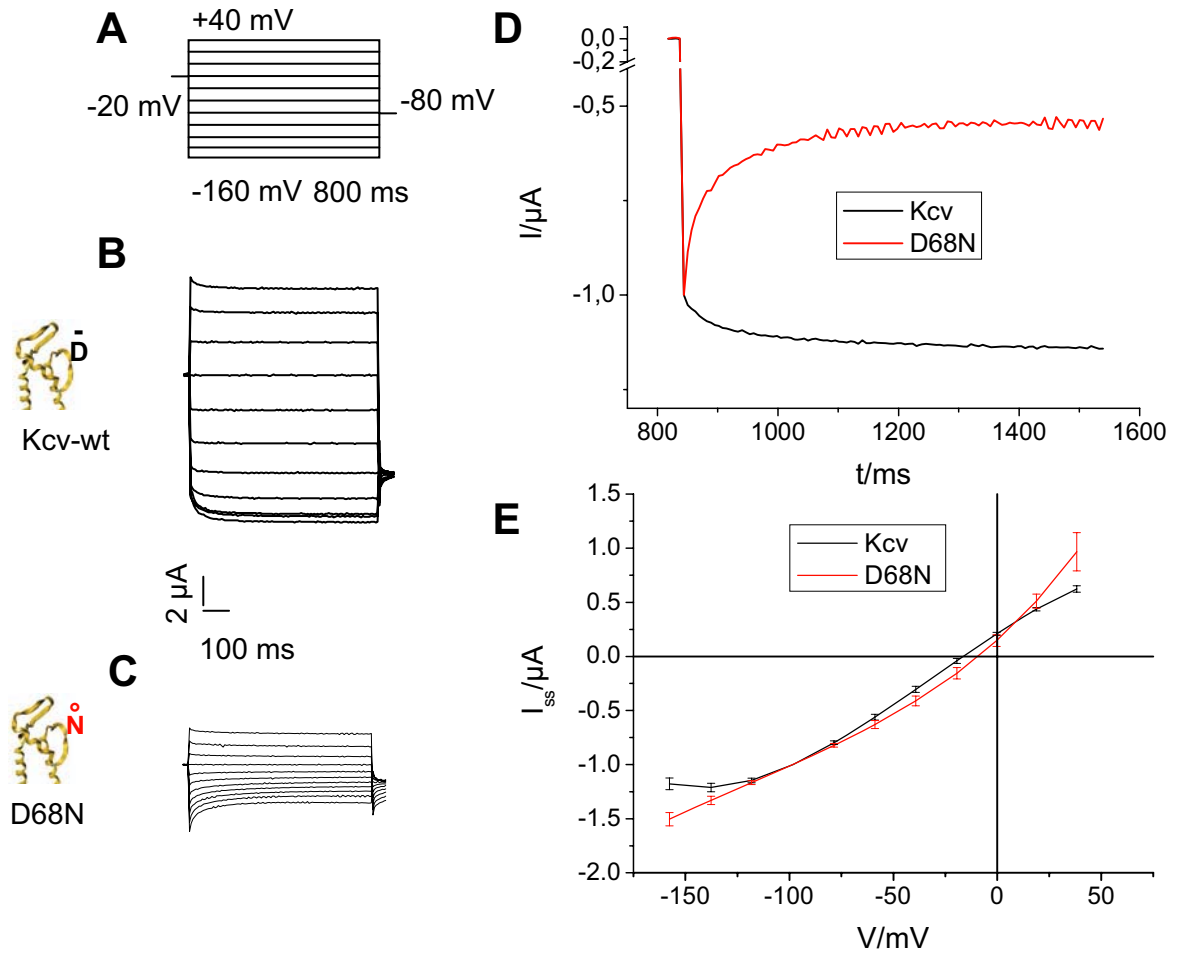


Abb. 3.16: Heterologe Expression der Kcv-Mutante D68N in *Xenopus* Oozyten

Stromantworten von Kcv-wt und der Mutante D68N (B; C) auf ein Standardpulsprotokoll (A). Einzelspurvergleich bei -140 mV mit auf Eins normiertem instantanem Strom (D). (E) Vergleich der auf -100 mV normierten Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv-wt (n=8) mit D68N (n=5). Am linken Bildrand: Schematische Darstellung eines Kcv-Monomerausschnittes mit rot hervorgehobenen Mutationen.

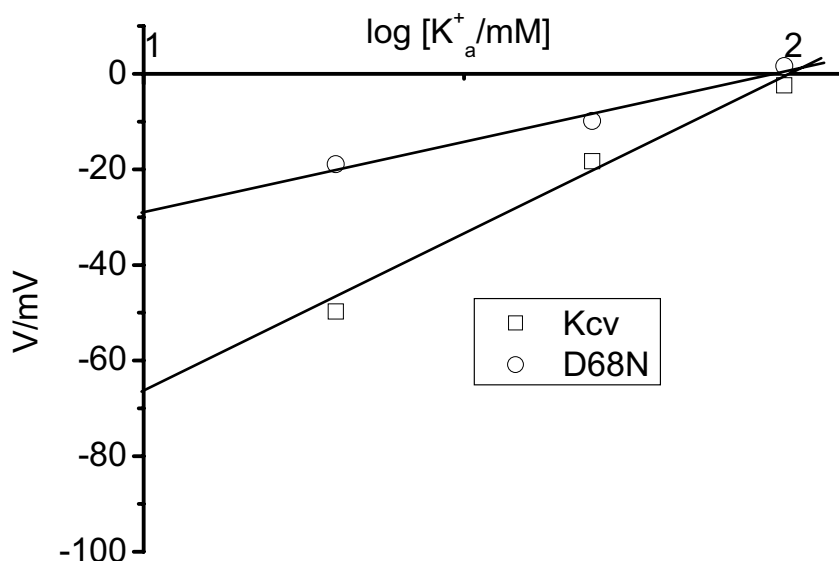


Abb. 3.17: Nernstplot von Kcv-wt und D68N

In dem Nernstplot sind die ermittelten Umkehrspannung bei 20, 50 und 100 mM K⁺ gegen den dekadischen Logarithmus der extrazellulären K⁺ Konzentration aufgetragen. Die lineare Regression ergibt für Kcv-wt eine Steigung von ca. 63 mV und für D68N eine Steigung von ca. 28 mV. Damit verliert die Mutante D68N die K⁺-Selektivität von Kcv-wt.

Einen Hinweis auf die verminderte K⁺ Selektivität gaben Experimente mit Na⁺ im Außenmedium. Als Folge des Lösungswechsels von K⁺ gegen Na⁺ wurde das Umkehrpotential für Kcv-wt um $58,9 \pm 4,7$ mV (n=4) in negativer Richtung verschoben, was auf eine deutlich niedrigere Permeabilität für Na⁺ gegenüber K⁺ hinweist. Bei D68N wird das Umkehrpotential um $5,8 \pm 2,3$ mV (n=2) ins Positive verschoben.

Einen weiteren Hinweis auf eine verminderte Selektivität geben Experimente mit Barium. Barium zeigte nur einen geringen Block von $13 \pm 11,4\%$ (n=5) im Gegensatz zu dem starken Block bei Kcv-wt ($91,96 \pm 4,98\%$ n=7). Zudem wird die Umkehrspannung durch die Applikation von Barium systematisch ins Positive verschoben ($3,0 \pm 1,5$ mV /n=5) (Abb.3.18). Dieser Befund suggeriert, dass der K⁺-Kanalinhibitor Barium einerseits seine inhibitorische Wirkung verliert und andererseits selbst den Kanal passieren kann.

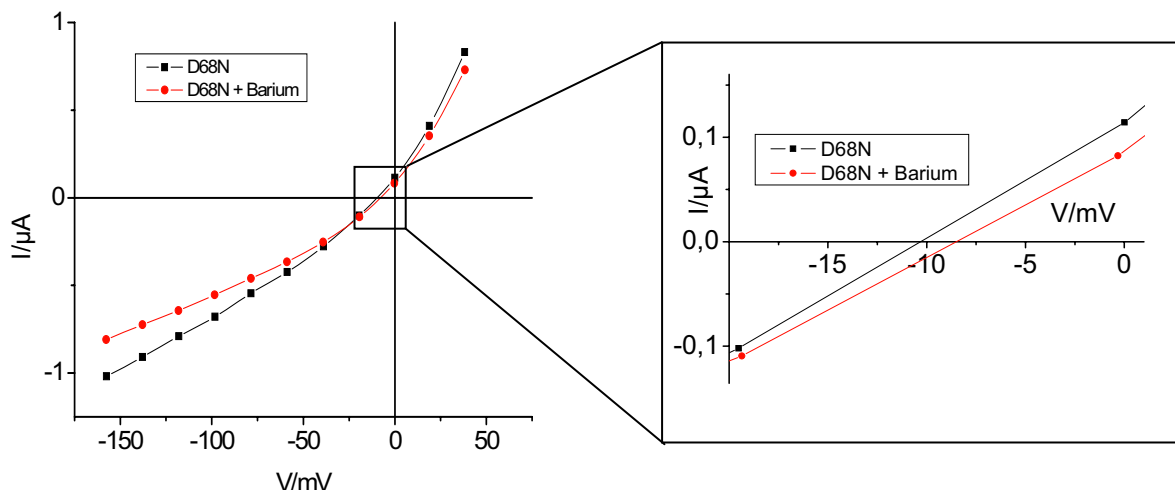


Abb. 3.18: Wirkung von Barium auf D68N

Links sind Strom-Spannungs-Beziehungen von D68N mit und ohne Barium Applikation dargestellt. Zu erkennen ist die minimale Wirkung von Barium auf die Mutante. Das *Inset* zeigt die Verschiebung der Umkehrspannung an dem dargestellten Beispiel um ca. +1,9 mV.

Die Applikation von 50 mM NMG⁺ zeigte bei -140 mV ebenfalls nur eine geringe Hemmung der Mutante D68N von $4,6 \pm 15,8\%$ ($n=4$); Kcv-wt hingegen lag bei $18,3 \pm 1,7\%$ ($n=13$).

Die Mutation von Aspartat zu Asparagin an der Position 68 verändert die Eigenschaften der Stromantwort drastisch. Der instantane Strom verliert die Reduktion bei negativen Spannungen. Die träge spannungsabhängige Komponente inaktiviert statt wie bei Kcv-wt zu aktivieren, und erfährt somit eine Inversion. Außer der stark veränderten Stromantwort zeigt D68N eine Veränderung in der Kaliumselektivität gegenüber Kcv-wt. D68N scheint für Natrium und auch Barium gut permeable zu sein. Zudem verlieren Barium und NMG⁺ die inhibitorische Wirkung auf die Mutante, was eine Charakterisierung erheblich erschwert.

3.2.6 Zeitkonstanten der auf zeitliche Aktivierung untersuchten Mutanten

In den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.3 wurden Zeitkonstanten für die trägen spannungsabhängigen Komponenten der verschiedenen Mutanten und Kcv-wt bei -140 mV und +40 mV vorgestellt. Dieser Abschnitt soll einen Überblick über die gesamten Ergebnisse der ermittelten Zeitkonstanten für die aktivierende Komponente (-140 mV) und die deaktivierende Komponente (+40 mV) vermitteln. In Tabelle 3.6 sind jeweils die zwei Zeitkonstanten aufgeführt, die den jeweiligen biphasischen Verlauf beschreiben. Die deaktivierende Komponente scheint im Gegensatz zu Kcv-wt bei den Mutanten keine relevanten Abweichungen aufzuweisen. Nur K47R zeigt in beiden Zeitkonstanten eine geringe Abweichung zu Kcv-wt.

Bezüglich der aktivierenden Komponente ist auffällig, dass sich die jeweiligen schnellen Zeitkonstanten, die die erste Phase der Stromantworten beschreiben, kaum unterscheiden. Die zweite Zeitkonstante beschreibt die zweite Phase der Stromantwort. Hier zeigt sich, dass drei Mutanten (K46A, K47A, K46R) inaktivieren. Diese drei Mutanten haben auch eine etwas erhöhte erste Zeitkonstante. Die Erhöhung der ersten Zeitkonstante könnte von der nachfolgenden Inaktivierung herrühren. Die Kcv-wt ähnlichen Mutanten (K47R, D45N) zeigen in beiden Zeitkonstanten nur geringfügige Abweichungen zu Kcv-wt.

Tab. 3.6: Zusammenstellung der ermittelten Zeitkonstanten für die trägen spannungsabhängigen Komponenten

Die in den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.3 gezeigten trägen spannungsabhängigen Komponenten wurden mit einer doppelten Exponentialfunktion (Gleichung 1) beschrieben und die aufgeführten Zeitkonstanten ermittelt.

	Aktivierende Komponente (-140 mV)		Deaktivierende Komponente (+40 mV)	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
Kcv-wt	10,9 ± 0,2 ms	38,05 ± 0,4 ms	20,9 ± 0,6 ms	105,8 ± 3,2 ms
K46A	17,1 ± 0,2 ms	420,5 ± 10,5 ms	16,1 ± 1,0 ms	111,7 ± 3,7 ms
K47A	19,9 ± 0,2 ms	447 ± 21,4 ms	15 ± 0,9 ms	108,8 ± 3,7 ms
K46R	18,9 ± 0,3 ms	570 ± 20,6 ms	17,8 ± 0,5 ms	99,6 ± 4 ms
K47R	12,9 ± 0,4 ms	40,3 ± 1 ms	32,8 ± 2,2 ms	157,3 ± 7,8 ms
D45N	14,3 ± 0,4 ms	49 ± 1,7 ms	17,8 ± 0,5 ms	132,4 ± 4,7 ms

Aus den ermittelten Zeitkonstanten für die aktivierende Komponente (-140 mV) ergeben sich zwei Gruppen:

- Die erste Gruppe besteht aus Kcv-wt, K47R und D45N:
Beide Phasen des biphasischen Stromverlaufes zeigen eine Aktivierung, die sich durch die Mutationen nicht in ihrem zeitlichen Verlauf und somit auch nicht in den Zeitkonstanten ändert.
- Die zweite Gruppe umfasst K46A, K47A und K46R:
Die erste Phase der Stromantwort zeigt eine schnelle Aktivierung, die in der zweiten Phase in eine Inaktivierung übergeht.

Werden die beiden Zeitkonstanten gegeneinander aufgetragen ergibt sich das soeben beschriebene Bild (Abb.3.19).

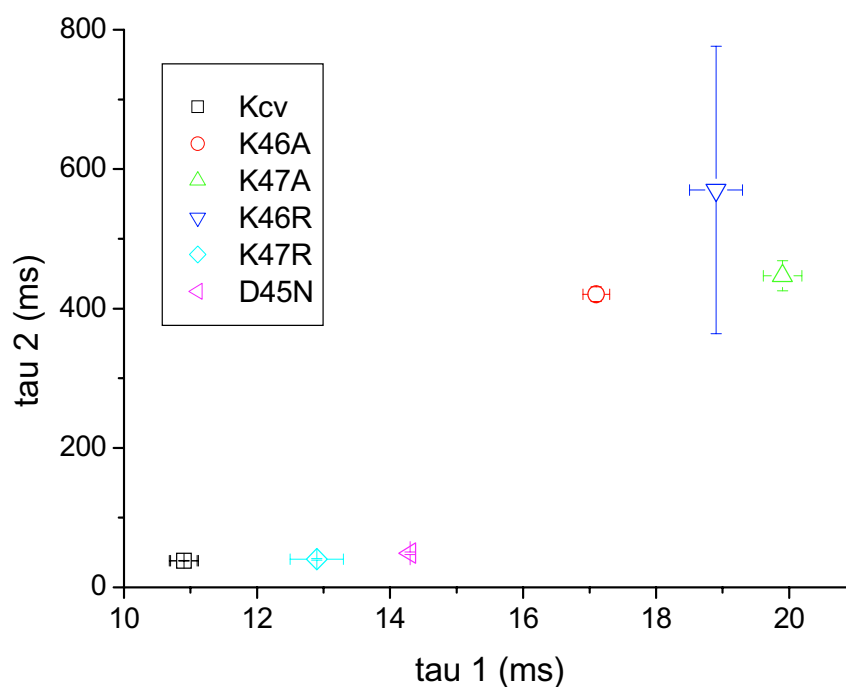


Abb. 3.19: Vergleich der Zeitkonstanten für die träge spannungsabhängige aktivierende Komponente

Aufgetragen ist die jeweilige erste Zeitkonstante gegen die jeweilig zweite Zeitkonstante. Hierbei liegen die in beiden Phasen aktivierenden Mutanten sowie Kcv-wt dicht beieinander. Die in der zweiten Phase inaktivierenden Mutanten liegen ebenfalls als Gruppe zusammen.

3.2.7 Verschiebung der Aktivierungskurven

Die Gouy-Chapman-Theorie besagt, dass durch Änderungen im elektrischen Feld spannungsabhängige Eigenschaften entlang der Spannungsachse verschoben werden (Abschnitt 1.3.1). Solche veränderten spannungsabhängigen Eigenschaften können sich beispielsweise in den Parametern eines Boltzmann-*Fits* einer Aktivierungskurve, wie der halbmaximalen Aktivierungsspannung (x_0) oder dem reziproken Steigungsfaktor (dx) niederschlagen. Hierbei korrespondiert das Ausmaß der Verschiebung mit der Größenordnung der neutralisierten Ladung. Herkömmliche Methoden der Neutralisation von Oberflächenladungen sind zielgerichtete Mutationen oder Abschirmung von negativen Ladungen durch meist polyvalente Kationen (Ehrenstein, 2001; Hille, 2001).

Prinzipiell ist die Verschiebung der Aktivierungskurve sowohl von den Ladungen der Lipidgruppen als auch von denen der Proteine abhängig. Wie jedoch aus Experimenten hervorgeht, nehmen lokale Oberflächenladungen im Falle von Kanälen den größeren Einfluss (Hille, 2001; Bell & Miller, 1984). Vorangegangene Studien zeigen, wenn auch mit Einschränkungen (Madeja, 2000), dass die Verschiebung der Aktivierungskurve von Kanälen und die berechneten Oberflächenladungen der entsprechenden Proteine korrelieren (Elinder *et al.*, 1997). Werden die in dieser Arbeit vorgestellten Kcv-Mutanten auf eine Verschiebung der Aktivierungsspannung in den Aktivierungskurven hin untersucht, ergeben sich die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Werte. Die Daten zeigen, dass zwischen Kcv-wt und allen Mutanten bei denen die Ladung durch die Mutation erhalten bleibt, keine Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung (x_0) zu beobachten ist (K46R, K47R, D45E). Werden die positiven Ladungen an den Positionen K46 und K47 durch Alanin neutralisiert, verschiebt sich der Mittelpunkt der Aktivierungsspannung (x_0) in positiver Richtung. Bei der Doppelmutante K46A/K47A kehrt sich die Spannungsabhängigkeit wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben um und die halbmaximale Aktivierungsspannung (x_0) verschiebt sich in positiver Richtung. Wird die negative Ladung D45 durch Asparagin neutralisiert, verschiebt sich der Mittelpunkt der Aktivierungsspannung (x_0) ebenfalls in positiver Richtung.

Die neutralisierten Mutanten zeigen folglich eine systematische Abweichung der Aktivierungskurven in Bezug zum Wildtyp. Allerdings beruhen die ermittelten Daten auf dem *Fit* von einzelnen, unabhängigen Datensätzen der Tailströme. Die Tailströme reflektieren die zeitabhängige Komponente des Kcv-Stroms, die nur eine geringe Ausprägung bei Kcv-wt bzw. den Kcv-Mutanten hat und demzufolge auch keine ausgeprägte Sättigung aufweist. Diese Tatsache erschwert die Präzision des Boltzmann-*Fits* und führt somit zu einer hohen Standardabweichung der einzelnen *Fits*. Aufgrund der relativ geringen Verschiebung der Aktivierungs-

kurven und der beträchtlichen Standardabweichung müssen die besprochenen Daten auf ihre Aussagekraft hin überprüft werden.

Hierfür wurden diejenigen Tailströme, welche auch zuvor für die einzelnen Boltzmann-*Fits* benutzt wurden, normiert. Der Tailstrom, der einer Aktivierungsspannung von -160 ± 3 mV folgt wird hierbei auf 1 und der Tailstrom der einer Aktivierung auf 0 ± 1 mV folgt auf Null normiert. Durch das Auftragen der normierten Kcv-wt Daten gegen die normierten Daten der Mutanten wird eine mögliche Abweichung sichtbar gemacht (Abb. 3.20). Kommen die zu vergleichenden Datenpunkte auf oder statistisch verteilt um die eingezeichnete Normlinie zum liegen, weicht die Aktivierungsspannung nicht von der des Wildtyps ab. Eine systematische Verteilung der Datenpunkte unterhalb der Normlinie spiegelt eine Verschiebung zu negativeren Potentialen wider; eine systematische Verteilung der Datenpunkte oberhalb der Normlinie reflektiert eine Verschiebung zu positiveren Potentialen. In Abbildung 3.20 ist am Beispiel von K46A zu erkennen, dass die Datenpunkte systematisch zu größeren Werten von der Normlinie abweichen; daraus kann auf eine geringfügige Verschiebung der Aktivierung geschlossen werden. Diese ist nicht so markant wie bei den unabhängigen Boltzmann-*Fits*, tendiert aber ebenfalls zu positiveren Potentialen.

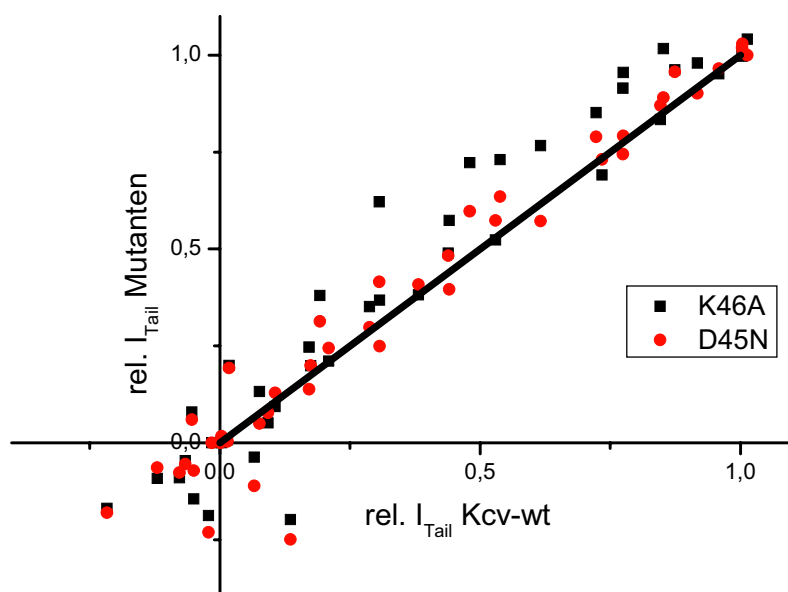


Abb. 3.20: Vergleich der normierten Tailströme von Kcv-wt mit K46A und D45N

Aufgetragen sind jeweils die normierten Tailströme von Kcv-wt gegen die von K46A bzw. D45N, wobei der Tailstrom bei -160 ± 3 mV auf 1 und der Tailstrom bei 0 ± 1 mV auf Null normiert wird. K46A zeigt eine deutlichere Abweichung zu Kcv-wt als D45N. Die Tendenz der Abweichung geht wie bei den unabhängigen Boltzmann-*Fits* zu positiveren Potentialen.

Für D45N ist allerdings nur eine geringe Abweichung zu Kcv-wt zu erkennen. Demzufolge sollten die einzelnen, unabhängigen Boltzmann-*Fits* nicht überinterpretiert werden, da sich die besprochenen Daten an der Auflösungsgrenze befinden. Nichtsdestotrotz muss festgehalten werden, dass bei neutralisierenden Mutationen in der *Turret*-Domäne eine Tendenz zu positiveren Aktivierungsspannungen zu beobachten ist.

Tabelle 3.7: Werte der gemittelten Aktivierungskurven von Kcv-Mutanten und Kcv-wt

Der Wert für die halbmaximale Aktivierungs-Spannung (X_0) und der reziproke Steigungsfaktor der Funktion (dx) wurde für Kcv-wt und die Kcv-Mutanten mit einer Boltzmann-Funktion (Gleichung 2) ermittelt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Werte bei 50 mM K^+ im Außenmedium bestimmt. n zeigt die Anzahl der eingehenden Messungen an.

	X_0	dx	n
Kcv-wt	$-81,6 \pm 10$ mV	$37,1 \pm 7,1$	5
Kcv-wt (100 mM K^+)	$-94,2 \pm 9$ mV	$43,8 \pm 7,7$	5
Kcv-wt (50 mM K^+ + 50 mM NMG $^+$)	$-94,4 \pm 10$ mV	$46,6 \pm 10$	4
K46A	$-64,4 \pm 6,4$ mV	$35,1 \pm 6$	5
K47A	$-61,2 \pm 12$ mV	$31,3 \pm 8$	9
K46A/K47A	$+59,9 \pm 9,2$ mV	$-25,2 \pm 5,7$	4
K46R	$-84,5 \pm 11$ mV	$29,3 \pm 5$	4
K47R	$-81,0 \pm 12$ mV	$38,6 \pm 6,2$	3
D45N	$-65,9 \pm 14$ mV	$44 \pm 7,9$	6
D45N (50 mM K^+ + 50 mM NMG $^+$)	-72 mV; -75 mV	70 88	2
D45N (100 mM K^+)	$-93,6 \pm 16,8$ mV	$52,3 \pm 5,4$	3
D45E	$-76,7$ mV $-82,3$ mV	40,2 37,6	2

Zusätzlich sagt der reziproke Steigungsfaktor (dx) etwas über den Übergang zwischen dem offenen und geschlossenen Zustand aus. Da es sich um den reziproken Wert der Steigung handelt, haben niedrigere Werte einen steileren Verlauf und somit ein kleineres Spannungsfenster für den Übergang von offen zu geschlossen, bzw. der Kanal schaltet schneller zwischen offen und geschlossen. Der Steigungswert sagt zusätzlich etwas über die Lage des „*gating* Faktors“ aus. Je steiler dx verläuft, umso zentraler liegt der *gating* Faktor im Protein. Nimmt die Steigung ab, so verlagert sich der *gating* Faktor weiter an die Peripherie des Proteins (Hille, 2001). Allerdings sind die Schwankungen im reziproken Steigungsfaktor (dx) nur sehr gering und sollen deshalb nicht überinterpretiert werden.

4. Diskussion

Elektrostatische Kräfte, ausgehend von geladenen Aminosäuren auf Proteinoberflächen, beeinflussen verschiedenste makromolekulare Funktionen. Beispielsweise bieten Oberflächenladungen der Superoxid Dismutase (SOD) eine elektrostatische Führung des Substrates zum Reaktionszentrum (Getzoff *et al.*, 1983, 1992; Sharp *et al.*, 1987). Auch für Ionenkanäle wurde gezeigt, dass Oberflächenladungen Einfluss auf Funktion und Leitfähigkeit der Kanalproteine haben. Dies ist zum Beispiel der Fall bei neuronalen Natriumkanälen (Sigworth und Spalding, 1980), Calcium aktivierten BK-Kanälen (MacKinnon und Miller, 1989; MacKinnon *et al.*, 1989), Kir2.1 Kanälen (D'Avanzo *et al.*, 2005) oder dem nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) (Iomoto *et al.*, 1988; Konno *et al.*, 1991).

Um die Wirkung von elektrostatischen Kräften auf die Funktion von Kaliumkanälen zu untersuchen, bietet sich der Miniatur-Kaliumkanal (Kcv) aus dem *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (PBCV-1) an. Das Protein stellt den bisher kleinsten bekannten funktionellen Kaliumkanal dar und korrespondiert grundsätzlich mit dem Poren-Modul anderer Kaliumkanäle (Plugge *et al.*, 2000; Gazzarrini *et al.*, 2004). Vor dem Hintergrund von Oberflächenladungen ist bei Kcv vor allem die *Turret*-Domäne interessant. Diese Domäne ist hoch konserviert in allen sechs Kcv-Typen, die bisher aus anderen Virenspezies isoliert wurden. In Zusammenhang mit der potentiellen Bedeutung dieser Domäne in der generellen Funktion von Kaliumkanälen (Shrivastava und Bahar, 2006) legt die Konservierung der *Turret*-Domäne in Kcv die Vermutung nahe, dass die exakte Struktur dieser Domäne für die Funktion des Proteins essentiell ist. Auffällig in der Struktur des *Turrets* ist eine Anhäufung von drei geladenen Aminosäuren, die entsprechend von Homologiemodellen an der Oberfläche des Kcv-Kanals (Gazzarrini *et al.*, 2004), also an der Grenze zur externen Lösung liegen.

In der vorliegenden Arbeit wurden potentielle Oberflächenladungen, bzw. solche die auf die Oberfläche Einfluss nehmen könnten, hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Funktion von Kcv untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass anders als aus der konservierten Struktur des *Turrets* vermutet, in dieser Domäne durchaus Mutationen toleriert werden. Wenn die geladenen Aminosäuren neutralisiert oder durch andere gleichartig geladene Aminosäuren ersetzt werden (Abb. 4.1), behält das Kanalprotein seine Funktion, auch wenn diese teilweise modifiziert ist. Das heißt, dass weder die exakte Ladung, noch die exakte sterische Struktur dieser Domäne für die generelle Funktion des Kanals essentiell ist.

Die Daten zeigen auch, dass die Architektur der *Turret*-Domäne dennoch nicht beliebig ist. Beispielsweise werden einzelne Mutationen, welche die jeweilige Ladung im *Turret* umkehren, nicht toleriert; die entsprechenden Mutanten leiten in *Xenopus* Oozyten keinen Strom. Aus den vorliegenden Daten kann nicht auf die Ursache für die fehlende Funktion dieser Mutanten geschlossen werden. Es ist sowohl möglich, dass die entsprechenden Mutationen dazu führen, dass die Proteine fehl gefaltet werden und gar nicht an die Membran transportiert werden; möglich ist jedoch auch, dass die prinzipiell funktionsfähigen Kanäle in der Membran auf Grund dieser Mutation inaktiv sind und daher nicht leiten. Aufschluss über den tatsächlichen Einbau von Kanalmutanten in die Plasmamembran, könnte ein HA-Epitop an der Außenseite des Kanals bringen (Kast *et al.*, 1995; Geisberg *et al.*, 1995). Mittels eines Antikörpers ist dann eine Oberflächendetektion der membranständigen Kanäle möglich, die Rückschlüsse auf Oberflächenexpression und veränderte Kanaldichte in der Membran zulässt.

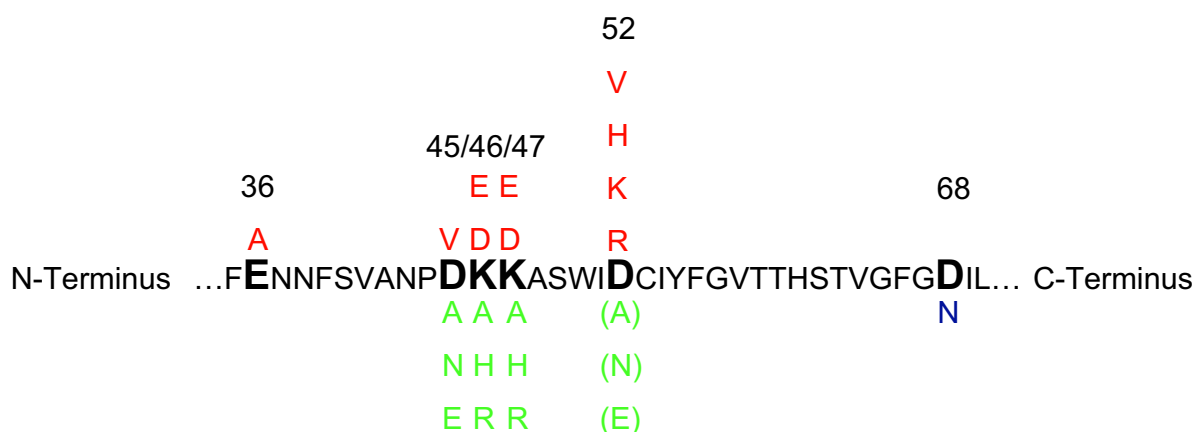


Abb. 4.1: Tolerierte und nicht tolerierte Mutationen in der *Turret*-Domäne von Kcv

Die Sequenz stellt die Aminosäurefolge der *Turret*-Domäne bis zum Filter dar. Die untersuchten geladenen Aminosäuren sind hervorgehoben. Tolerierte Mutationen sind grün, nicht tolerierte Mutationen rot abgebildet. Die in Klammern stehenden Mutationen konnten nur sehr selten gemessen werden. Blau ist die Mutation dargestellt, die toleriert wird, aber die phänotypische Erscheinungsform nachhaltig verändert.

Wie gerade beschrieben, funktionieren einige Mutanten von Kcv trotz Mutation in der *Turret*-Domäne als Kaliumkanäle. Die generellen Tests dieser Mutanten bezüglich ihrer Ionenselektivität und Pharmakologie zeigen, dass sie sich nicht wesentlich vom Wildtyp unterscheiden. Die *Turret*-Domäne hat dementsprechend offensichtlich keinen Einfluss auf den Permeationsweg des Ions durch den Selektivitätsfilter.

Ein Vergleich der Stromamplituden zwischen Wildtyp-Kanal und Mutanten zeigt jedoch, dass alle funktionellen Mutanten eine signifikant reduzierte Stromamplitude im Vergleich zu Kcv-wt haben. Diese Reduktion des Gesamtstroms kann mehrere Ursachen haben. Der Gesamtstrom setzt sich, wie in Gleichung 3 beschrieben, aus der Einzelkanalleitfähigkeit, der Kanalanzahl in der Membran und der Offenwahrscheinlichkeit zusammen. Prinzipiell können alle diese Parameter aus Einzelkanalmessungen bzw. aus Rauschanalysen sowie die Kanalanzahl (N) aus der oben genannten Dichteermittlung von Kanälen gewonnen werden.

$$I_{gesamt} = i \times N \times P_0 \quad (\text{Gleichung 3})$$

I_{gesamt} = Gesamtstrom der durch die Kanäle fließt

i = Einzelkanalstrom

N = Anzahl der leitenden Kanäle

P_0 = Offenwahrscheinlichkeit

Versuche zur Analyse der Einzelkanalleitfähigkeit mittels Varianz-Analyse scheiterten, da die Stromantworten in den Ganzzellaufzeichnungen im Vergleich zum Einzelkanalstrom zu groß sind (D'Avanzo *et al.*, 2005). Ohne die Quantifizierung der Parameter aus Gleichung 3 bleibt die Interpretation der Daten daher erst einmal hypothetisch. In Analogie zu Befunden aus anderen Arbeiten kann jedoch angenommen werden, dass die veränderte Oberflächenstruktur des Proteins wohl am ehesten zu einer verminderten Leitfähigkeit, d.h. einer Reduktion des Offenkanalstroms führt. Arbeiten an anderen Kaliumkanälen haben gezeigt, dass veränderte Ladungsverhältnisse im Protein zu einer verminderten Leitfähigkeit führen können (Brelidze *et al.*, 2003; Haug *et al.*, 2005; D'Avanzo *et al.*, 2005; Nimigean *et al.*, 2003; MacKinnon *et al.*, 1989).

Der folgende Rückschluss kann einen Hinweis geben, ob die verminderte Leitfähigkeit der Kcv-Mutanten auf einen reduzierten Einzelkanalstrom zurückzuführen ist: Die Ermittlung der Leitfähigkeit erfolgte bei -140 mV. Bei dieser Spannung sind alle Kcv-wt Kanäle aktiviert, da die halbmaximale Aktivierungsspannung bei ca. -80 mV liegt und die ermittelte Steigung der Kurve suggeriert, dass alle Kanäle ab einer Spannung von ca. -100 mV aktiviert sind (Tab. 3.7 und Abb. 4.2). Kommt es bei den Kcv-Mutanten zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung, so geschieht dies in positiver Richtung (Tab. 3.7) daher sollte eine Aktivierung aller membranständigen Kanäle bei -140 mV gewährleistet sein. Daher scheint die Offenwahrscheinlichkeit (P_0) nicht der entscheidende Parameter für die Leitfähigkeitsverminderung zu sein. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass sich die Kanalanzahl (N) und/oder die Einzelkanalstrom (i) ändern. Auch wenn es nicht ausgeschlossen werden kann,

so spricht doch wenig dafür, dass die Mutationen durchgängig die Kanalanzahl (N) reduzieren. Also ist am wahrscheinlichsten, dass sich die Einzelkanalleitfähigkeit (i) ändert.

Eine solche Verringerung der Leitfähigkeit in Folge von Mutationen in der *Turret*-Domäne kann durch elektrostatische Effekte erklärt werden, die für die erhöhte lokale Kaliumkonzentration vor der Pore verantwortlich sind (Brelidze *et al.*, 2003; Nimigean *et al.*, 2003). Außerdem können auch makromolekulare Effekte von Bedeutung sein. Die *Turret*-Domäne könnte Teil eines Makrodipols sein und die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Kaliumions innerhalb der Pore beeinflussen (Chung *et al.*, 2002; Abschnitt 1.3.2). Allerdings zeigen auch ladungskonservierende Mutationen eine geringere Leitfähigkeit als der Wildtyp, was gegen die Theorie eines essentiellen und einzig funktionsgebenden Makrodipols spricht. Da jedoch neutrale und ladungskonservierende Substitutionen Einfluss auf die Leitfähigkeit haben, lässt sich ebenfalls schließen, dass die exakte Zusammensetzung in Form und Ladung der Aminosäureseitenketten in der *Turret*-Domäne durchaus die Funktion des Kanals beeinflusst.

4.1 Mutationen von extrazellulären Ladungen führen zu einer Änderung in der Kinetik und in der Spannungsabhängigkeit von Kcv

Obgleich alle eingehend untersuchten Mutanten mit Veränderungen im *Turret* eine ähnliche Spannungsabhängigkeit und Kinetik aufweisen wie Kcv-wt, zeigen sie doch im Detail bemerkenswerte Unterschiede zum Wildtyp. Bei genauerer Betrachtung kann für die Mutanten K46A, K46R und K47A bei negativen Spannungen eine träge Inaktivierung festgestellt werden, die zu einem zweiphasigen Verlauf in der zeitabhängigen Komponente des Stromes führt. Ferner ergibt sich für die Mutanten K46A und K47A nicht aber für K46R und K47R eine Verschiebung der Aktivierungskurve zu positiveren Potentialen. Das heißt, die veränderte Kinetik ist nicht kausal an die veränderte Spannungsabhängigkeit gekoppelt. Bei dem ladungskonservierenden Austausch von Lysin mit Arginin an der Position 46 (K46R) erfolgt zwar eine Inaktivierung aber keine Änderung der Aktivierungsspannung. Demzufolge ist die Inaktivierung nicht durch die reine Ladungsdichte an der Proteinoberfläche zu erklären, sondern durch sterische Änderungen in der *Turret*-Domäne. Dabei können sekundäre Effekte, wie eine Positionsänderung des gesamten Ladungsbereichs auch bei einer ladungskonservierenden Mutation, nicht ausgeschlossen werden. Ursache für eine Positionsänderung kann der sterisch große Stickstoffanteil in der Seitenkette von Arginin sein (3 endständige Stickstoffreste/Guanidin-Gruppe). Dem gegenüber steht nur eine endständige Stickstoffgruppe im Lysin.

Ein konsistentes Bild ergibt sich für die Spannungsabhängigkeit der trägen Komponente der

Kcv-Leitfähigkeit in Bezug auf die Oberflächenladungen. Während alle Mutanten, die die elektrische Ladung an den entsprechenden Positionen konservieren, keinen nennenswerten Einfluss auf die Spannungsabhängigkeit haben, verschiebt sich die Aktivierungskurve in Folge einer Neutralisation der Ladungen zu positiveren Spannungen (Tab. 3.7; Abb. 3.20). Obwohl, wie in Abschnitt 3.2.7 besprochen, sich die Daten an der Auflösungsgrenze befinden, wird die Aktivierungsspannung bei allen neutralisierten Mutanten zu positiveren Potentialen verschoben.

Besonders dramatisch ist die Änderung in der Spannungsabhängigkeit bei der Doppelmutante K46A/K47A. In diesem Fall führt der Verlust von zwei Ladungen zu einer Umkehrung der Spannungsabhängigkeit; die träge Komponente des Kanals wird nominell von einem Einwärtsgleichrichter in einen Auswärtsgleichrichter überführt.

Eine ähnlich dramatische Änderung wie bei der K46A/K47A Mutante konnte auch im spannungsabhängigen und auswärtsgleichrichtenden *Shaker*-Kanal gefunden werden (Miller and Aldrich, 1996). Eine 3-fache Mutation im S4-Segment (R, L, R) von *Shaker* verursachte eine Verschiebung der Aktivierungskurven zu hyperpolarisierenden Potentialen und eine Umkehrung von einem Auswärtsgleichrichter zu einem Einwärtsgleichrichter (Miller und Aldrich, 1996).

Auch innerhalb der natürlich vorkommenden Kcv-Typen hat sich gezeigt, dass bei einer natürlichen Variante von Kcv aus dem Virus MA-1D eine solche Umkehrung stattfinden kann (Gazzarinni *et al.*, 2004), wobei sich der hier untersuchte Referenzkanal von PBCV-1 und MA-1D-Kcv nur an fünf Positionen unterscheiden. Analysen identifizierten zwei funktionelle Positionen, die für den geänderten Phänotyp verantwortlich sind. Diese befinden sich in der ersten Transmembranhelix (F19) und in der Porenhelix (I54) und sind in der Lage PBCV-1-Kcv und MA-1D-Kcv in den jeweils anderen Phänotyp zu überführen (Gazzarinni *et al.*, 2004). Interessanterweise spricht die Analyse dieser Homologe für weitreichende Interaktionen zwischen der ersten Transmembranhelix und der Porenhelix. Dabei wird eine Kopplung zwischen diesen Domänen postuliert (Gazzarinni *et al.*, 2004). Diese Gegebenheit und der Befund der Doppelmutante K46A/K47A zeigen, dass die phänotypischen Veränderungen nicht kausal an eine einzelne Aminosäure gekoppelt sind, sondern dass ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Domänen für diese Eigenschaften von Kcv verantwortlich ist. Die *Turret*-Domäne und sein Ladungscharakter könnten Teil dieses Arrangements sein.

Neben dem Ladungscharakter der verschiedenen Aminosäuren können auch zusätzliche Effekte eine Rolle bei der veränderten Kanalfunktion spielen. Das substituierte Lysin hat definitiv einen größeren sterischen Einfluss auf die *Turret*-Domäne als Alanin. Dieser Unterschied und die veränderte Ladungsdichte könnten eine Positionsveränderung des gesamten

Ladungsbereichs herbeiführen. Durch eine solche Konformationsänderung kann die effektive Oberflächenladung modifiziert und inkonsistente Effekte hervorgerufen werden (Ehrenstein, 2001).

Konsistent mit der Gouy-Chapman-Theorie zeigt sich die Substitution von Aspartat mit dem isosterischen Asparagin (D45N). Die Neutralisation des Aspartats führt innerhalb der einzelnen, unabhängigen Boltzmann-*Fits* zu einer vergleichbaren Verschiebung der Aktivierungskurven in positiver Richtung wie bei K46A und K47A. Der Vergleich der genormten relativen Tailströme ergibt gegenüber K46A eine deutlich geringere Verschiebung (Abb. 3.20).

In anderen Untersuchungen zur Analyse von Oberflächenladungen wird häufig NMG^+ eingesetzt, um negative Oberflächenladungen abzuschirmen (D'Avanzo *et al.*, 2005).

Wird die Neutralisation der Oberflächenladung im Kcv Protein durch NMG^+/Cl^- imitiert, so zeigt sich anders als erwartet eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativen Potentialen (Tab. 3.7). Nach der Gouy-Chapman-Theorie wäre eine Verschiebung zu positiveren Potentialen zu erwarten. Jedoch ist auch in diesem Fall klar, dass die Gouy-Chapman-Theorie nicht in ihrer einfachen Form anzuwenden ist, weil selbst die neutralisierte Mutante zumindest eine geringe Reaktion auf NMG^+/Cl^- Behandlung zeigt. Einerseits können andere negative Ladungen geringe Effekte hervorrufen (D68), andererseits können hierbei auch andere NMG^+/Cl^- vermittelte Effekte eine Rolle spielen.

Ein möglicher Effekt könnte die veränderte Anionenkonzentration durch die NMG^+/Cl^- Lösung sein. NMG^+ hat in diesem Experiment wie Kalium, Chlorid als Anion. Daher ist die Anionenkonzentration einer 100 mM K^+ -Lösung mit der einer 50 mM K^+ /50 mM NMG^+ -Lösung zu vergleichen. Die Vermutung, dass die Verschiebung der Aktivierungskurve zu negativen Werten durch Anionen bewirkt wird, ist im Einklang mit zwei experimentellen Befunden:

- Unabhängig davon, ob die Anionenkonzentration in Form von K^+/Cl^- oder NMG^+/Cl^- erhöht wird, verschiebt sich die Aktivierungskurve von Kcv zu negativen Potentialen (Abb. 4.3);
- Auch bei der neutralisierten Mutante D45N wird durch K^+/Cl^- oder NMG^+/Cl^- die Aktivierungskurve in negativer Richtung verschoben.

Diese Beobachtung wurde anhand von Lösungswechseln an ein und derselben Zelle gemacht, daher sollten die in Abschnitt 3.2.7 geäußerten Bedenken zur Interpretierbarkeit der Daten hier nicht ins Gewicht fallen.

Der Vergleich der normierten, relativen Tailströme von Kcv-wt in 50 mM Cl^- bzw. 100 mM Cl^- (Abb. 4.3) gibt eine Verschiebung der Aktivierung zu negativen Potentialen zu erkennen. Dies bestätigt die zuvor in Tabelle 3.7 beschriebene Tendenz der einzelnen, unabhängigen

Boltzmann-Fits.

Die Messergebnisse machen deutlich, dass die Gouy-Chapman-Theorie nicht ausreichend ist, um die gefundenen Daten zu erklären. Überdies sind die Abweichungen in der Kinetik und in der Spannungsabhängigkeit, mit Ausnahme der Mutante K46A/K47A, nur geringfügig.

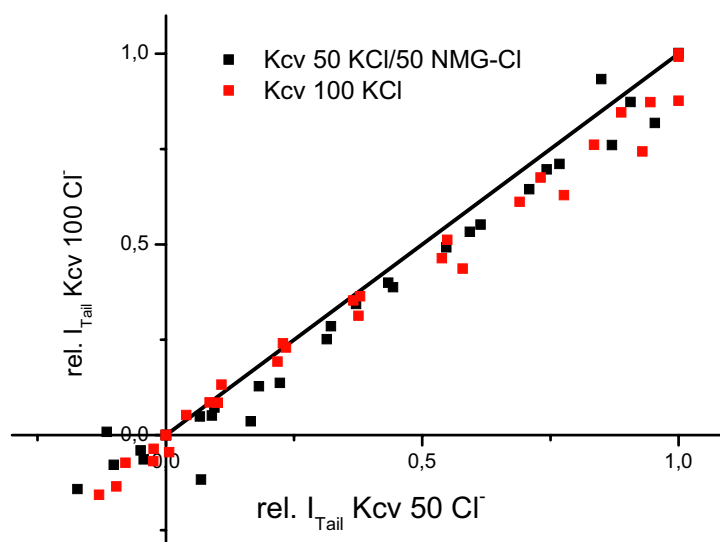


Abb. 4.2: Vergleich der normierten Tailströme von Kcv-wt (50 mM KCl) mit 100 mM KCl und 50 mM KCl/50 mM NMG-Cl

Aufgetragen sind jeweils die normierten Tailströme von Kcv-wt (50 mM KCl) gegen die von Kcv-wt mit 100 mM KCl und 50 mM KCl/50 mM NMG-Cl. Hierbei wurden die Tailströme bei ca. 160 mV auf 1 und der Tailstrom bei ca. 0 mV auf Null normiert wird. Kcv-wt mit 100 mM KCl und 50 mM KCl/50 mM NMG-Cl zeigt eine Abweichung zu negativen Potentialen und bestätigt die Tendenz der einzelnen, unabhängigen Boltzmann-Fits.

Die Befunde können demnach folgendermaßen zusammengefasst werden: Die Ladungen in der *Turret*-Domäne sind nicht essentiell für die generelle Funktion des Kanals. Dennoch ist die exakte sterische Beschaffenheit der Aminosäuren in der *Turret*-Domäne von Bedeutung für funktionelle Parameter, wie makroskopische Leitfähigkeit und spannungsabhängige Aktivierungs-Prozesse im Kanal.

Hypothetische Annahmen über die räumliche Anordnung der untersuchten Ladungen könnten folgendes Bild ergeben: Homologiemodellierung von Kcv-wt auf Basis der Kristallstruktur von KirBac1.1 lässt vermuten, dass D45 nicht an der Oberfläche exponiert liegt. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass es zusammen mit dem benachbarten D52 den negativen Gegenpol zu den positiven Ladungen K46 und K47 bildet. Das am N-terminalen Ende der Porenhelix

gelegene Aspartat (D52) konnte in Mutationsversuchen nur durch das isosterische Asparagin oder das ebenfalls negativ geladene Glutamat ausgetauscht werden. Die Mutanten produzieren allerdings nur in wenigen Oozyten eine spezifische Leitfähigkeit. Dieser Befund unterstreicht die große funktionelle Bedeutung des Aspartats an der Position 52 und steht im Einklang mit der Hypothese, dass diese Aminosäure als negativer Gegenpol für positive Ladungen im Umfeld fungiert.

Ein Bild über die mögliche Anordnung der Ladungen in der Filterregion vermittelt Abbildung 4.3. Dargestellt ist ein Kcv-Monomerausschnitt vom Selektivitätsfilter über die Porenhelix bis zu den Ladungen in der *Turret*-Domäne. Die magentafarbenen Sphären symbolisieren die Kaliumionen.

Extrazellulärer Bereich

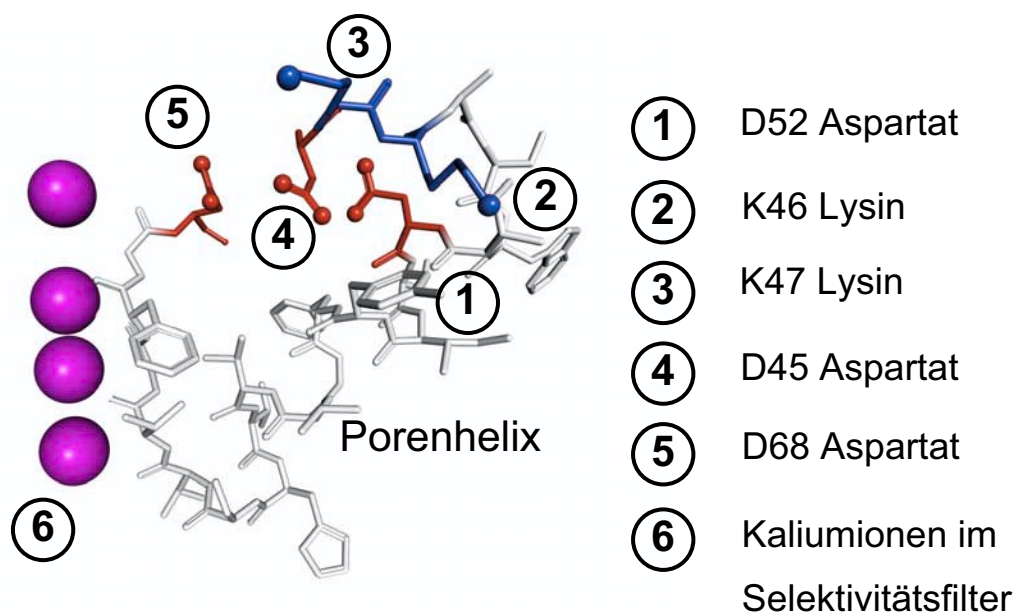


Abb. 4.3: Auf der Basis von KirBac1.1 modellierter Kcv-wt Monomerausschnitt

Seitenansicht eines Kcv-wt Monomerausschnitts. Die magentafarbenen Sphären symbolisieren Kaliumionen im Selektivitätsfilter. Daneben ist die mögliche Anordnung der Aminosäuren rund um die Filterregion (blau=Lysin; rot=Aspartat) gezeigt. Bild generiert von S. Tayefeh und S.M. Kast mittels MOLCAD © J. Brickmann.

4.2 D68N bildet einen Ring aus negativen Ladungen um die externe Kanalpore

Das Aspartat (D) an Position 68 ist Teil der Signatursequenz TVGF GD , die in Kaliumkanälen mit spannungsabhängigen Eigenschaften hoch konserviert ist (Heginbotham *et al.*, 1992). Aus der vierfachen Symmetrie von Kaliumkanälen ergibt sich durch diese Aminosäure ein Ring aus negativen Ladungen um die Kanalpore. In KcsA ragt dieser Ring deutlich aus dem Rückgrat des Selektivitätsfilters hervor (Moraes-Cabral *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Ob der Aspartat-Ring nun aus dem Kanal herausragt oder mehr im Protein eingebettet ist, ändert nichts an der Tatsache, dass eine Substitution mit Asparagin die Kanaleigenschaften im Beispiel von Tok 1 grundlegend verändert (Roller *et al.*, 2005). Der Auswärtsgleichrichter Tok 1 zeigt bei der Mutation von zwei der vier Aspartate zu Asparagin eine modifizierte Kanalaktivierung. Diese resultiert in einer schnelleren Kanalaktivierung und in einer sehr schnellen, fast vollständigen Inaktivierung von Tok 1 (Roller *et al.*, 2005).

Der Spannungs- und Calcium-aktivierte Kaliumkanal, BK_{Ca} (Maxi K) zeigt bei der korrespondierenden Mutation in der Untereinheit hSlo eine Umwandlung eines Ohmschen Kanals in einen Auswärtsgleichrichter (Haug *et al.*, 2004). Die Neutralisation an der entsprechenden Stelle im *Shaker*-Kanal und anderen K_v-Kanälen führte zur Aufhebung jeglicher Leitfähigkeit (Hurst *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1998). Diese reduzierte Leitfähigkeit kann durch K⁺-Verarmung vor der Pore entstehen. Es ist bekannt, dass Kaliumkanäle kollabieren, wenn K⁺-Ionen aus der Pore entfernt werden (Almers und Armstrong, 1980; Zhou *et al.*, 2001). Das konservierte Glutamat am C-terminalen Ende des Selektivitätsfilters von BK_{Ca}-Kanälen soll vor dem extrazellulären Poreneingang K⁺ Ionen akkumulieren und so zur Stabilität der Pore und einer hohen Einwärtsleitfähigkeit beitragen (Haug *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Strom-Spannungs-Beziehung von Kcv nach der Mutation D68N zu der eines einfachen Ohmschen Widerstands tendiert. Möglicherweise könnte bei Kcv, wie auch bei anderen Kanälen, die Mutation dazu führen, dass es am Poreneingang zu einer Verarmung an K⁺-Ionen und damit zu einer Kollabierung oder Torsion des Selektivitätsfilters kommt (Almers und Armstrong, 1980; Zhou *et al.*, 2001). Für diese Interpretation spricht auch, dass der Einwärtsstrom in seiner Kinetik stärker verändert ist als der Auswärtsstrom. Die veränderte Kinetik des Einwärtsstroms der Mutante zeigt eine zeitliche Abnahme im Gegensatz zu einer Zunahme im Wildtyp und ist im Einklang mit der Hypothese, dass eine K⁺-Verarmung vor dem extrazellulären Poreneingang für die veränderte Funktion verantwortlich ist. Dieses Modell wird von biochemischen Untersuchungen gestützt,

in denen die Tetramerstruktur von Kcv durch K^+ in der Pore stabilisiert wird (Doktorarbeit C. Pagliuca, Universita' degli Studi di Milano, 2005). Experimentelle Versuche, bei denen die K^+ -Konzentration verdoppelt wurde, konnten jedoch in der Kcv-Mutante D68N die Kcv typische Leitfähigkeit nicht wieder herstellen. Da jedoch Energiebarrieren in einem logarithmischen Maß von der Konzentration abhängen, kann die Verdoppelung der K^+ -Konzentration auch zu gering sein, um merkliche Effekte auf die Kanalfunktion zu zeigen.

Die hochauflösende KcsA Struktur (Zhou *et al.*, 2001) zeigt, dass das betreffende Aspartat im Selektivitätsfilter mit einem Glutamatrest in der Porenhelix eine starke Carboxyl-Carboxylat Verbindung eingeht, die wichtig für die Stabilität des Filters ist (Choi und Heginbotham, 2004; Cordero-Morales *et al.*, 2006). In anderen bakteriellen Kanälen ist diese Interaktion ebenfalls vorhanden (Kuo *et al.*, 2003); ähnliche elektrostatische Interaktionen existieren in Kir-Kanälen (*inward rectifier*) (Yang *et al.*, 1997); in spannungsabhängigen eukaryotischen Kanälen konnte noch keine Verbindung nachgewiesen werden (Cordero-Morales *et al.*, 2006). Allerdings konnte Chapman (Chapman *et al.*, 2001) zeigen, dass in einem 2-Domänen-Tandem-Kanal der Ratte (Drk1) zwischen dem Tyrosin (Y) von GYGD und dem Aspartat (D) des benachbarten Monomers eine Interaktion besteht. Wobei sich Y als wichtig für die K^+ -Selektivität und D als wichtig für die Stabilität des offenen Kanals herausstellte. Hierbei vermindert die Mutation von Tyrosin (Y) zu Leucin (L) (und vermutlich auch Phenylalanin (F)) die Selektivität des Kanals (Chapman *et al.*, 2001).

Mutationen von geladenen Aminosäuren in der Poren-Region können erhebliche Konformationsänderungen hervorrufen. Kristallstrukturen einer Mutante von KcsA, in der ein Glutamat in der Porenhelix neutralisiert wurde (E71A), zeigte zwei verschiedene Konformationszustände (Cordero-Morales *et al.*, 2006). Der eine Konformationszustand kam dem Wildtyp sehr nahe, der andere zeigte starke Unterschiede in der Anordnung der Aminosäure-Seitenketten. Im Beispiel für das Aspartat am extrazellulären Eingang der Pore von KcsA können solche Konformationsänderungen zwischen 0,5 und 8 Å ausmachen. Diese Konformationsänderungen haben einen großen Effekt auf die Position und Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Kaliumionen im Selektivitätsfilter. Elektrophysiologisch wirkt sich das beispielsweise als stark erhöhte Offenwahrscheinlichkeit von KcsA aus (Cordero-Morales *et al.*, 2006).

In dem viralen Ionenkanal Kcv könnte ebenfalls eine Interaktion mit Aminosäuren aus der *Turret*-Domäne, der Porenhelix oder dem Selektivitätsfilter bestehen und so die Selektivität beeinflussen. Bei der Mutante D68N ist die Selektivität für Kalium erheblich reduziert. Solche drastischen Veränderungen wurden für andere Kaliumkanäle nicht berichtet (Haug *et al.*, 2004; Roller *et al.*, 2005). Der Befund für die Kcv-Mutante D68N, dass die K^+ -Selektivität deutlich reduziert ist und anscheinend Na^+ und sogar Ba^{2+} gut permeieren, könnte ebenso

darauf schließen lassen, dass D68 eine Interaktion mit dem benachbarten F66 im Selektivitätsfilter ausbildet. Das Aspartat (D68) könnte folglich in der Lage sein, durch funktionelle Interaktionen mit dem Selektivitätsfilter der benachbarten Domäne, die Ionen-Selektivität fein abzustimmen (Chapman *et al.*, 2001).

An die Mutation D68N ist nicht nur eine stark modifizierte Selektivität gekoppelt, sondern auch der Verlust der Bariumblockierbarkeit. Durch Komplementationsstudien in Hefe konnte ein funktioneller Klon gefunden werden, der unter anderem an der Position 68 ein Tyrosin aufweist. Die einzelne Mutation D68Y (Diplomarbeit: Francesca Cortini, Università degli Studi di Milano, 2004) zeigt wie D68N eine stark herabgesetzte Wirkung von Barium auf die Leitfähigkeit. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das Aspartat (D68) eine entscheidende Rolle bei der Inhibition des Kanals durch Barium spielt und eine extrazelluläre Bariumbindungsstelle darstellen könnte (Hurst *et al.*, 1995; Jiang und MacKinnon, 2000).

Barium (1,35 Å) besitzt nur einen geringfügig größeren Radius als Kalium (1,33 Å) (Hille, 2001). Eine Konformationsänderung im Selektivitätsfilter durch die D68N-Mutation könnte den Filter insofern verändern, dass Barium zwar permeieren kann, aber an der internen Bariumbindungsstelle kurz interagiert und so einen reduzierten Strom verursacht. Die interne Bariumbindungsstelle befindet sich am N-terminalen Ende des Selektivitätsfilters, am Übergang zur Kavität (Jiang und MacKinnon, 2000). Nachfolgende Kaliumionen könnten diese kurze Interaktion zwischen Barium und dem Selektivitätsfilter wieder lösen. Dieser Mechanismus könnte die leicht verminderte Stromantwort und die minimal verschobene Umkehrspannung bei D68N durch Barium erklären.

Insgesamt bestätigen die experimentellen Daten mit Kcv die vorherigen Befunde an anderen Kaliumkanälen: Der Aspartat-Ring um die extrazelluläre Pore bestimmt grundlegend die Kanaleigenschaften von Kanälen. Im speziellen Fall von Kcv wird durch die Substitution mit Asparagin ein nahezu Ohmscher-Kanal erzeugt. Ferner wird der Selektivitätsfilter stark beeinflusst; der Kanal kann nicht mehr zwischen Kalium und anderen Kationen selektieren. Dies könnte auf Aminosäure-Interaktionen von D68 mit Aminosäuren innerhalb der Poren-Region schließen lassen. Außerdem ist das Aspartat direkt an der Inhibition von Kcv durch Barium beteiligt. Vermutlich befindet sich hier eine extrazelluläre Barium-Bindungsstelle.

Das Aspartat an der Position 68 scheint direkt an dem Aufbau des Selektivitätsfilters beteiligt zu sein und ist daher nicht im Kontext mit den Daten der geladenen Aminosäuren in der *Turret*-Domäne zu sehen. Allerdings können Interaktionen zwischen den beiden Domänen nicht ausgeschlossen werden.

5. Theoretische Analyse der Elektrostatik und der Kalium- bzw. Chloriddichte von PBCV-1-Kcv und dessen Mutanten anhand von Homologie-Modellen

Nach den elektrophysiologischen Betrachtungen zur Wirkung von Oberflächenladungen im Kcv-Kanal soll auch eine theoretische Analyse miteinbezogen werden, die in Kooperation mit der AG Kast (Physikalische Chemie I, TU Darmstadt) entstanden ist. Hierbei werden auf der Basis von Homologie-Modellen der betrachteten Mutanten statistische Theorien angewendet, die als Ergebnis die Verteilungen von elektrostatischem Potential und Ionen in der Nähe des Proteins liefern, was mit der Aktivität korreliert werden kann.

Gegenwärtig ist noch keine Kristallstruktur von Kcv vorhanden, dennoch legt die Homologiemodellierung des Kcv-Kanals auf der Basis der Kristallkoordinaten von KirBac1.1 (Kuo *et al.*, 2003) nahe, dass die Struktur des viralen Kcv-Kanals der des bakteriellen Kanals ähnlich ist. Der Vorgang des *Alignment* ist in Gazzarrini *et al.* (2004) und Einzelheiten zur Modellierung in Hertel *et al.* (2006) detaillierter beschrieben. Ein solches 3D-Modell ist nur eine Annäherung an die konkrete Struktur von Kcv, ermöglicht aber dennoch grundlegende Einblicke in den Zusammenhang zwischen Strukturen und Funktionen im viralen Kanal ohne globale Konformationsänderungen des Proteins zu berücksichtigen.

Ein erster Schritt zum Verständnis auf atomarer Ebene wird durch Anwendung der Poisson-Boltzmann-Theorie (Honig und Nicholls, 1995) möglich. Hierbei wird auf der Basis einer Kontinuumsbeschreibung der Protein-Umgebung über die phänomenologische Dielektrizitätskonstante das elektrostatische Potential im Raum um das Kanalprotein berechnet. Die Ergebnisse der elektrostatischen Berechnungen für Kcv-wt und ausgewählte Mutanten mittels Poisson-Boltzmann-Theorie unter Ausschluss eines Membranmodells und einer formalen Ionenstärke von 0 sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Abgebildet sind die Seitenansichten der verschiedenen Kanäle und ihre Adsorptionsräume, wobei blau für negatives Potential (primär relevant für die Adsorption von Anionen) und rot für positives Potential (relevant für Kationen) kodiert. Auffällig ist, dass die potentiell von der Membran umgebene Oberfläche aller Proteine elektrostatisch heterogene Eigenschaften aufweist, dies spiegelt wahrscheinlich den Charakter eines membranständigen Proteins wider.

Ein Adsorptionsraum von Anionen schließt sich auf der cytoplasmatischen Seite (unten) an. Dieser ändert sich nur geringfügig bei allen berechneten Kanalproteinen. Die extrazellulär

exponierte Oberfläche (oben) verändert erwartungsgemäß mit jeder Mutation auch die Elektrostatik. Der Wildtyp verfügt zentral über positive und peripher über negative Adsorptionsbasins. Durch Neutralisation einer zentral gelegenen negativen Ladung (D45N), wird der elektrostatische Charakter des Wildtyps nachhaltig verändert. Der zuvor nur peripher lokalisierte Adsorptionsraum von Anionen weitet sich weiter in das Zentrum des Kanals aus. Der anscheinend stark verringerte Adsorptionsraum von Kationen, könnte die ebenfalls stark verringerte Leitfähigkeit der D45N Mutante in Bezug auf Kcv-wt erklären. Bei Substitution von positiven Ladungen durch neutrale Aminosäuren (K46A, K47A und K46A/K47A) tritt der konträre Effekt ein, der Adsorptionsraum für Kationen vor der Pore wird erweitert. Dies geschieht auf Kosten des negativen Adsorptionsraums an der Peripherie der Kcv-Mutanten. Dieser Befund könnte ebenfalls das Phänomen der verringerten Leitfähigkeit verständlich machen, da zwar der zentrale Adsorptionsraum für Kationen vergrößert wird, aber die kontinuierliche Nachlieferung aus der Kanalperipherie möglicherweise ausbleibt.

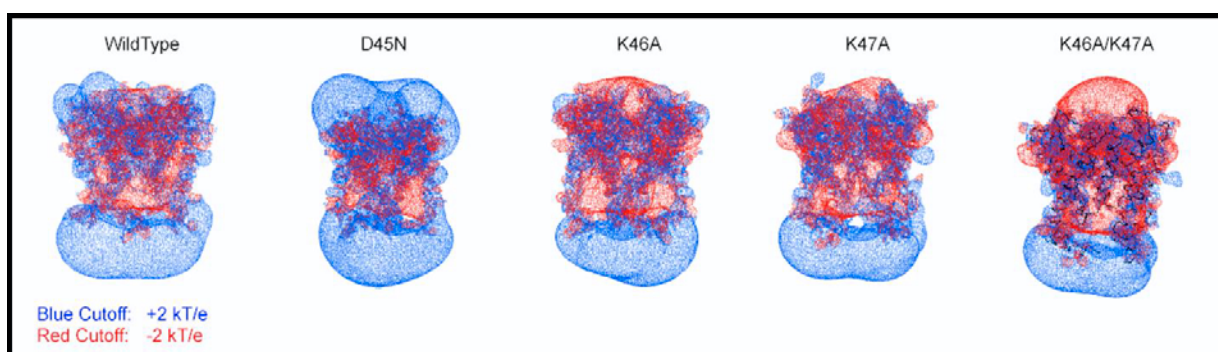


Abb. 5.1: Elektrostatisches Potential auf der Oberfläche von Kcv-wt und dessen Mutanten mittels Poisson-Boltzmann Berechnungen

Seitenansicht auf die berechnete elektrostatische Potentialverteilung von Kcv-wt und dessen Mutanten. Das zentral gelegene Protein wird von polarisierten Adsorptionsräumen umgeben, rot bedeutet Attraktion von Kationen und blau von Anionen. Die Poisson-Boltzmann-Berechnungen erfolgten mit dem Swiss SPDB Viewer. Die Dielektrizitätskonstante (ϵ) für das Solvent, in diesem Falle reines Wasser, ist 80 und für das Protein 4 (Rechnungen und Bild: S. Tayefeh).

Aus den rein elektrostatischen Potentialverteilungen lässt sich nicht ohne weiteres auf die Aktivitätsähnlichkeiten der in Abb. 5.1 dargestellten Mutanten zurück schließen, insbesondere das Verhalten von D45N steht nicht im Einklang mit den substantiellen Potentialunterschieden, die im Vergleich mit den anderen Mutanten beobachtet werden. Zur Erklärung wird daher ein detaillierteres theoretisches Modell benötigt, das insbesondere die Kooperativität der beteiligten Kationen und Anionen adäquat wiedergibt. Zu diesem Zweck wird die so genannte dreidimensionale Integralgleichungstheorie im Rahmen des 3D-RISM-Ansatzes (*reference interaction site model*) verwendet (Kovalenko und Hirata, 1999a und 1999b; Beglov

und Roux, 1997). Die Weiterentwicklung und Anwendung dieser Methodik auf Ionenkanal-Proteine in Gegenwart von Salzlösungen wird gegenwärtig von S. M. Kast und Mitarbeitern vorangetrieben. Auf der Basis eines atomaren Modells der Wechselwirkungen der Proteinzentren mit Wasseratomen (H und O) bzw. Elektrolyten (K^+ und Cl^-) ergibt sich im Ergebnis die Dichte der einzelnen Solvensspezies als Funktion des Ortes \mathbf{r} im dreidimensionalen Raum. Die relative Dichte ($g_{ion}(\mathbf{r})$) ist direkt mit der Gleichgewichts-Freie-Energiefläche (w) (in Abwesenheit eines externen Feldes) für den Ionentransport verknüpft, dem so genannten *potential of mean force* (pmf). Hierbei gilt:

$$w_{ion}(r) = -kT \ln g_{ion}(r) \quad (\text{Gleichung 4})$$

w = Gleichgewichts-Freie-Energiefläche bzw. *potential of mean force* (pmf) einer einzelnen Solvensspezies

g = relative Dichte einer einzelnen Solvensspezies

k = Boltzmann Konstante

T = Temperatur

Hohe Dichtewerte entsprechen also stark attraktiven Raumbereichen, die die proteinspezifische treibende Kraft für den Transport ausmachen. Man kann also erwarten, dass topographische Eigenschaften speziell von Kalium-Dichtefeldern mit der Aktivität von Mutanten korrelieren sollten, auch wenn dynamische Aspekte und konformationelle Änderungen in dieser Betrachtung außer Acht gelassen werden.

Die Kalium- bzw. Chloriddichten aus der 3D-RISM-Theorie in der Umgebung des vollsolvatisierten Kcv-Proteins ohne Membran und für verschiedene Mutanten der *Turret*-Domäne sind in Abb. 5.2 – 5.4 dargestellt. Dafür wurden die 3D-Dichtefunktionen für 100 mM K^+ bzw. 100 mM Cl^- im Rahmen des CHARMM-Modellkraftfeldes (Brooks *et al.*, 1982) und der Kovalenko-Hirata-Closure berechnet (T. Kloss und S. M. Kast). Der Protonierungszustand der Aminosäuren entspricht dem Standard bei pH 7 der einzelnen Aminosäuren.

Für die Aussagekraft der Berechnung sprechen die Ergebnisse aus Abb. 4.6. Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch Kcv-wt samt der berechneten Kalium- bzw. Chloridverteilung. Die diffusen Wolken (Abb. 5.2 – 5.4) entsprechen der jeweiligen Teilchendichte von K^+ bzw. Cl^- . Hierbei entspricht im Farbcode rot einer hohen, gelb einer mittleren und farblos einer geringen Teilchendichte. In Abbildung 5.2 ist eine hohe Kaliumdichte genau dort vom Modell vorhergesagt, wo sie gefordert wird, nämlich im Permeationsweg des Kanals; sogar eine mögliche Bindungsstelle im Selektivitätsfilter ist zu erkennen. Ebenfalls den Vorstellungen entspricht das Ergebnis für die Chloriddichte (Abb. 5,2), da weder in der Kavität noch im Selektivitätsfilter eine signifikante Chloriddichte vorhergesagt wurde. Neben den erwarteten Dichtevorhersagen von Kalium im Permeationsweg zeigt das Modell auch, dass es sowohl an der äußeren wie auch an der inneren Seite des Kanals zu distinkten Clustern von erhöhter Kalium- bzw. Chloriddichte kommt.

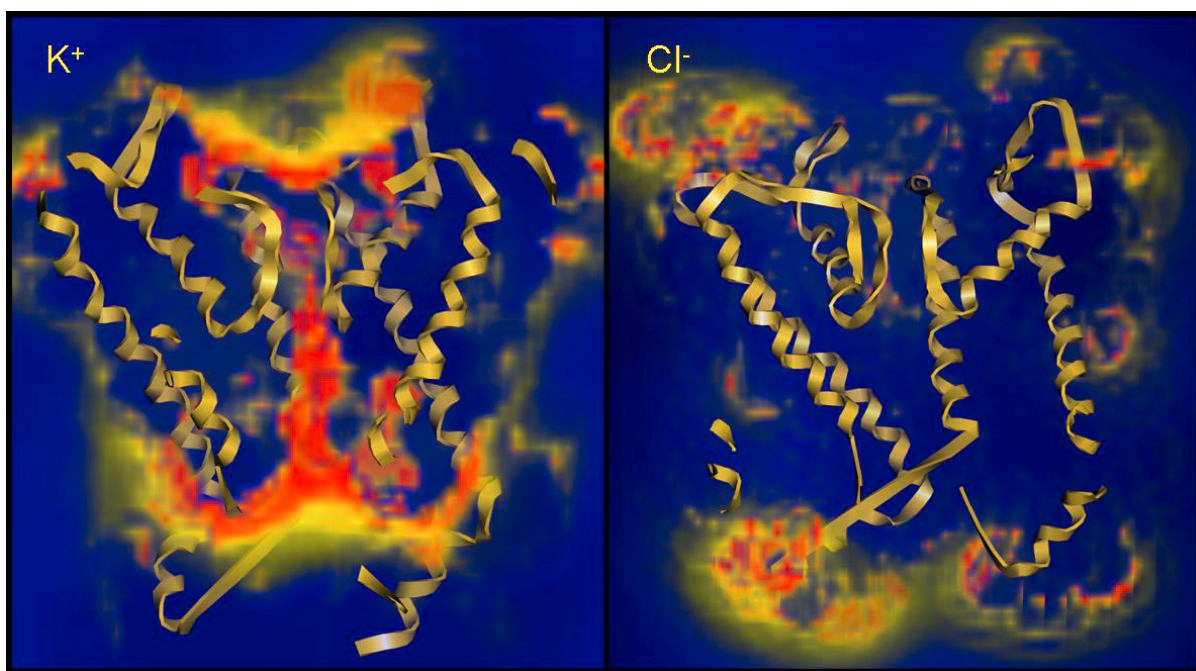


Abb. 5.2: 3D-Dichtefunktion für Kalium bzw. Chlorid

Querschnitt durch die Pore von Kcv-wt. Gut zu erkennen ist der Permeationsweg von Kalium durch die Pore. Die Farben kodieren die Kalium- bzw. Chloriddichte: rot = hoch, gelb = mittel, farblos = geringe Kalium- bzw. Chloriddichte. Bild generiert mittels MOLCAD (entwickelt von J. Brickmann).

Eine Aufsicht des Kcv-wt Modells aus Abb. 5.2 ist in Abbildung 5.3 dargestellt. In jeder Untereinheit des Kanals ist zur Orientierung jeweils eine der geladenen Aminosäuren als Kalottenmodell abgebildet. Im Uhrzeigersinn von rechts oben ausgehend: D45 (Aspartat), D68, K47 (Lysin) und K46. In der Aufsicht auf den Kanal ergibt sich für Kalium (Abb. 5.3; links) ein symmetrisches Kreuz über der Pore, dessen Schenkel über das DKK-Motiv der *Turret*-Domäne verlaufen. Vor allem D45 und D68 scheinen für die hohe Kaliumdichte vor der Pore verantwortlich. Um die beiden Lysine (K46 und K47) herum ist analog eine verstärkte Chloridkonzentration zu beobachten (Abb. 5.3; rechts).

Diese Anordnung lässt darauf schließen, dass D68 und D45 verstärkt eine Attraktion auf Kalium ausüben und so Kaliumionen vor der Pore akkumulieren. K46 und K47 scheinen durch Interaktionen mit Chlorid, dessen Gegenion (K^+) vor der Pore zu koordinieren und gewährleisten so eine hohe Kaliumdichte vor der Pore. Das DKK-Motiv scheint folglich für die Ausbildung von „Ionenbahnen“ zwischen der Pore einerseits und der Kanalperipherie andererseits verantwortlich zu sein. Diese Hypothese scheint berechtigt, da Bereiche hoher Kaliumdichte den Reaktionspfaden für den Kaliumtransport in der Nähe der Pore selbst entsprechen.

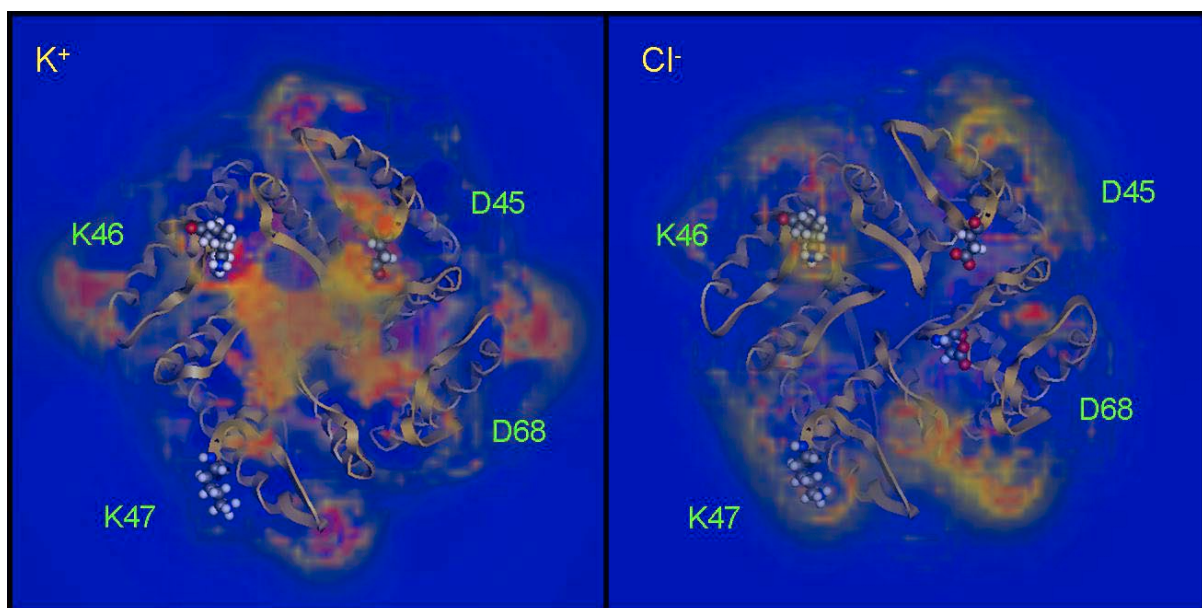


Abb. 5.3: 3D-Dichtefunktion für Kalium bzw. Chlorid

Aufsicht auf Kcv-wt mit den geladenen Aminosäuren als Kalottenmodell. Im Uhrzeigersinn von rechts oben ausgehend: D45, D68, K47 und K46. Die Farben kodieren die Kaliumdichte: rot = hoch, gelb = mittel, farblos = geringe Kalium- bzw. Chloriddichte. Bild generiert mittels MOLCAD.

Abbildung 5.4 zeigt die Lösung der 3D-Paarverteilungsfunktion für Kcv-wt und die verschiedenen *Turret*-Mutanten. Das DKK-Motiv bzw. seine mutierten Entsprechungen sind in einer Untereinheit (rechts oben) als Kalottenmodell dargestellt. Bei dem Vergleich zwischen Kcv-wt und den Mutanten fällt primär auf, dass das generelle Muster der Kaliumdichte-Verteilung erhalten bleibt, obwohl die rein elektrostatische Potentialverteilung darauf nicht hingedeutet hat; es handelt sich also um einen kooperativen Effekt des gesamten Elektrolyten. Dieser Eindruck bestätigt die geringen Effekte der Mutationen im elektrophysiologischen Experiment und die beobachteten Einflüsse der Gegenionen. Bei genauerer Betrachtung fallen jedoch kleinere Unterschiede in der Teilchendichte auf. Bezogen auf die Kaliumdichte (Abb. 5.4, obere Reihe) ist bei der D45N Mutante deutlich eine Verringerung vor der Pore zu erkennen. Dieser verringerte Aufenthaltsraum von Kalium kann ein Grund für die verminderte Leitfähigkeit von D45N sein.

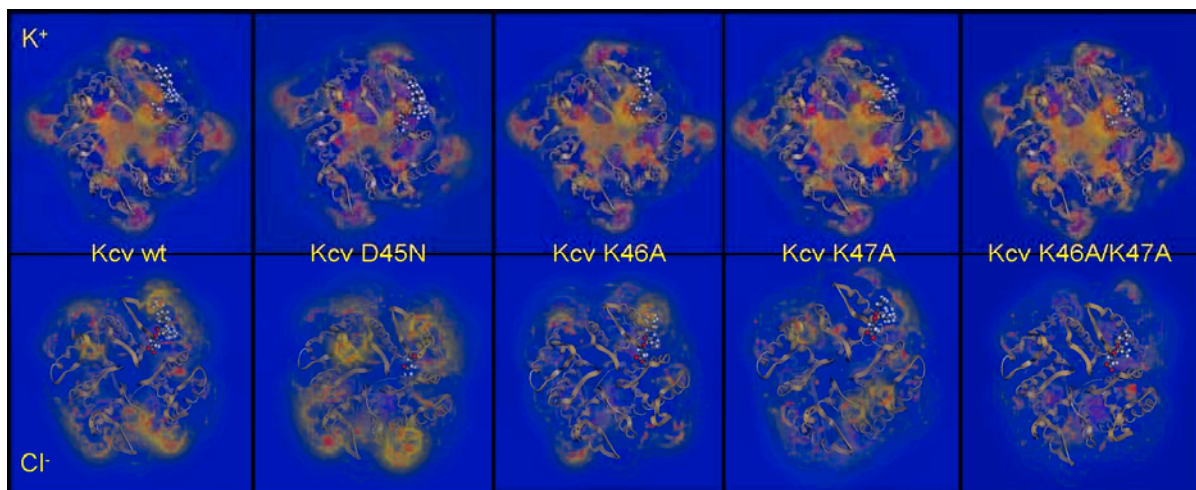


Abb. 5.4: 3D-Dichtefunktion für Kalium bzw. Chlorid

Aufsicht auf Kcv-wt und den funktionellen Mutanten der *Turret*-Domäne. Die obere Reihe bildet die Berechnungen für Kalium ab, die untere die für Chlorid. Die Farben kodieren die Kalium- bzw. Chloriddichte: rot = hoch, gelb = mittel, farblos = geringe Kalium- bzw. Chloriddichte. Bild generiert mittels MOLCAD.

Die drei Lysin-Mutanten (K46A, K47A, K46A/K47A) zeigen in Bezug auf Kalium keine auffälligen Unterschiede. In Bezug auf Chlorid zeigen jedoch alle drei Mutanten eine stark verminderte Ionendichte. In abnehmender Folge ist das K47A, K46A und deutlich am wenigsten hat K46A/K47A. Unter Umständen ist dadurch der Nachschub von Kalium vor der Pore begrenzt und die Leitfähigkeit der Kanäle reduziert. Bei vollständiger Neutralisation der positiven Ladungen könnte allerdings auch die Diffusion der Kaliumionen von der Pore weg erleichtert werden und so den permeierenden Ionen weniger Widerstand entgegen setzen. Diese Vorstellung könnte die Umkehrung von Kcv-wt in einen eher Auswärtsgleichrichtenden Kanal durch die Doppelmutante K46A/K47A erklären.

Wird die Berechnung der Kaliumdichte auf nicht funktionelle Mutanten angewendet, ergeben sich hinsichtlich der Kalium- bzw. Chloriddichte klare Unterschiede zum Wildtyp und den tolerierten Kcv-Mutanten. Am Beispiel von D45K (Abb. 5.5) zeigt sich, dass die zuvor beschriebenen „Ionenbahnen“ für Kalium unterbrochen sind und der Aufenthaltsraum für Kalium deutlich reduziert ist. Zusätzlich wird der Aufenthaltsraum für Chlorid (Abb. 4.9; rechts) im Vergleich zu Kcv-wt stark expandiert. Diese erhöhten Abweichungen zu Kcv-wt und den tolerierten Kcv-Mutanten sind für alle bisher berechneten nicht tolerierten Mutanten gültig.

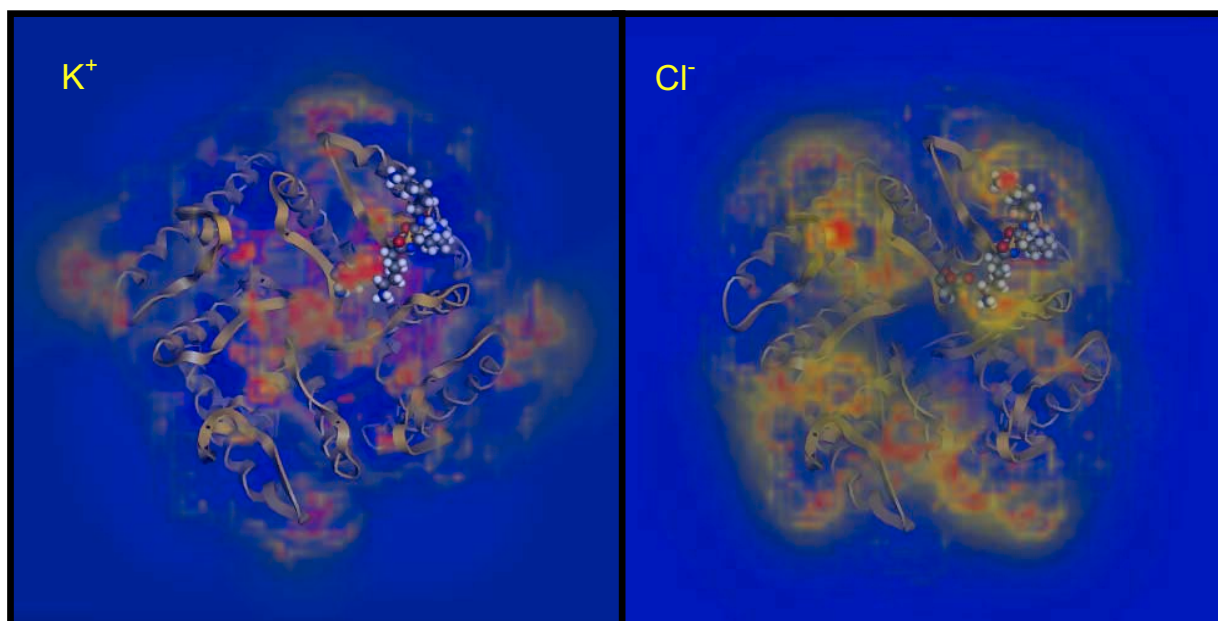


Abb. 5.5 : 3D-Dichtefunktion für Kalium bzw. Chlorid für die inaktive Kcv-Mutante D45K

Aufsicht auf die inaktive Kcv-Mutante D45K mit den geladenen Aminosäuren als Kalottenmodell. Deutlich zu erkennen sind die unterbrochenen „Ionenbahnen“ bei den Kaliumberechnungen (links) und der vergrößerte Aufenthaltsraum für Chlorid (rechts) in Bezug auf Kcv-wt. Die Farben kodieren die Kaliumdichte: rot = hoch, gelb = mittel, farblos = geringe Kalium- bzw. Chloriddichte. Bild generiert mittels MOLCAD.

Die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen erlauben, tolerierte und nicht tolerierte Mutationen als Kaliumdichte-erhaltende bzw. nicht erhaltende Störungen aufzufassen. Es fällt auf, dass die Kcv-Sequenz und der resultierende Proteinaufbau offenbar in der Lage sind, lokale Fluktuationen der elektrostatischen Verhältnisse zu kompensieren, um einen ungestörten Kationentransport zu ermöglichen. Es wird interessant sein zu untersuchen, ob es sich hierbei um ein gemeinsames Bauprinzip von Kaliumkanälen handelt.

6. Zusammenfassung

Der Kaliumkanal Kcv aus dem *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* (PBCV-1) ist einer der kleinsten funktionellen Kaliumkanäle und deshalb als Minimalmodell für die Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen besonders geeignet. Die vorliegende Arbeit ist auf funktionelle Eigenschaften von extrazellulären Oberflächenladungen fokussiert. Einem hoch konservierten Motiv von geladenen Aminosäuren in der *Turret*-Domäne (Asp, Lys, Lys/DKK-Motiv) kommt dabei eine zentrale Rolle zu.

Während alle funktionellen Mutanten des DKK-Motivs in den Basisfunktionen des Kanals, wie Pharmakologie und Ionen-Selektivität, im Vergleich zum Wildtyp keine wesentlichen Unterschiede aufweisen, zeigten alle Mutanten eine signifikant herabgesetzte Leitfähigkeit, die im Zusammenhang mit einer reduzierten Einzelkanalleitfähigkeit diskutiert wird. Ein weiteres beobachtetes Phänomen, ist eine Verschiebung der spannungsabhängigen Eigenschaften (Aktivierungsspannung) aller Mutanten, bei denen eine oder mehrere Oberflächenladungen neutralisiert wurden. Im Extremfall führt dies zur Umkehrung der Spannungsabhängigkeit.

Außerdem konnte in Bezug auf die Kinetik der Lysin-Mutanten innerhalb des DKK-Motivs eine Inaktivierung statt einer Aktivierung im biphasischen Verlauf der trägen spannungsabhängigen Komponente festgestellt werden. Alle neutralisierten Mutanten, aber auch eine ladungskonservative Mutante (K46R), weisen dieses Phänomen auf. Die veränderte Kinetik wird nicht mit einer veränderten Nettoladung, sondern mit mutationsbedingten Konformationsänderungen in Verbindung gebracht.

Die experimentellen Daten führen zu dem Schluss, dass die Ladungen in der *Turret*-Domäne nicht essentiell für die generelle Funktion des Kanals sind und keinen Einfluss auf den Permeationsweg des Ions durch den Selektivitätsfilter haben. Die exakte sterische Beschaffenheit der Aminosäuren in der *Turret*-Domäne ist jedoch für funktionelle Parameter von Bedeutung.

Ein um die extrazelluläre Pore gelegener negativ geladener Ring, bestehend aus Aspartat (D) ist ein weiterer Untersuchungsaspekt dieser Arbeit. Anhand von isosterischer Neutralisation mit Asparagin (N), konnten Kanaleigenschaften von Kcv grundlegend beeinflusst werden. Die hohe Kaliumselektivität und die Blockierbarkeit durch Barium gehen verloren. Zudem tendiert die Strom-Spannungs-Beziehung, mit einer typischen Abnahme an Leitfähigkeit bei negativen Spannungen, zu einem annähernd Ohmschen-Kanal mit nahezu linearer Strom-Spannungs-Beziehung. Folglich ist durch diese Mutation die Geometrie des Selektivitätsfilters, einschließlich der Barium-Bindungsstelle im Filter, grundsätzlich verändert.

Theoretische Analysen zur Elektrostatik und Kaliumdichteverteilung geben Anlass zu der Annahme, dass der negativ geladene Ring um die Pore, im Zusammenspiel mit dem DKK-Motiv, „Ionenbahnen“ auf der Oberfläche des Kanals ausbilden und so die Akkumulation von Kalium vor der Pore einerseits und die Nachlieferung des Substrats aus der Peripherie des Kanals andererseits gewährleistet.

Die Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen erlauben, tolerierte und nicht tolerierte Mutationen als Kaliumdichte-erhaltende bzw. nicht erhaltende Störungen aufzufassen. Es fällt auf, dass die Kcv-Sequenz und der resultierende Proteinaufbau offenbar in der Lage sind, lokale Fluktuationen der elektrostatischen Verhältnisse zu kompensieren, um einen ungestörten Kationentransport zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit verschafft einen Einblick in die elektrophysiologische Relevanz der *Turret*-Domäne bzw. von Oberflächenladungen für den Kaliumkanal Kcv und bietet eine modellbasierte Vorstellung zur Erklärung der auftretenden Phänomene.

7. Literaturverzeichnis

Almers W, Armstrong CM (1980). Survival of K^+ permeability and gating currents in squid axons perfused with K^+ -free media. *J. Gen. Physiol.* 75(1): 61-78.

Beglov D, Roux B (1997). An Integral Equation to describe the solvation of polar molecules in liquid water. *J. Phys. Chem.* 100(1): 7821-7826.

Bell JE, Miller C (1984). Effects of phospholipid surface charge on ion conduction in the K^+ channel of sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 45(1): 279-287.

Berneche S, Roux B (2001). Energetics of ion conduction through the K^+ channel. *Nature* 414: 73–77.

Bertani G (1952). Studies on lysogenesis. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.

Bertl A, Ramos J, Ludwig J, Lichtenberg-Frate H, Reid J, Bihler H, Calero F, Martinez P, Ljungdahl PO (2003). Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol. Microbiol.* 47(3): 767-780.

Brelidze TI, Niu X, Magleby KL (2003). A ring of eight conserved negatively charged amino acids doubles the conductance of BK channels and prevents inward rectification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(15): 9017-9022.

Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1982). CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4(2): 187-217.

Carrasco L (1995). Modification of membrane permeability by animal viruses. *Adva. Virus Res.* 45: 61-112.

Chapman ML, Krovetz HS, VanDongen AM (2001). GYGD pore motifs in neighbouring potassium channel subunits interact to determine ion selectivity. *J. Physiol.* 530(Pt 1): 21-33.

Chatelain FC, Alagem N, Xu Q, Pancaroglu R, Reuveny E, Minor DL, Jr (2005). The Pore Helix Dipole Has a Minor Role in Inward Rectifier Channel Function. *Neuron.* 47: 833-843.

Choi H, Heginbotham L (2004). Functional influence of the pore helix glutamate in the KcsA K^+ channel. *Biophys. J.* 86: 2137-2144.

Chung SH, Allen TW, Hoyles M, Kuyucak S (1999). Permeation of ions across the potassium channel: brownian dynamics studies. *Biophys. J.* 77(5): 2517-2533.

Chung SH, Allen TW, Kuyucak S (2002). Modeling Diverse Range of Potassium Channels with Brownian Dynamics. *Biophys. J.* 83: 263-277.

Cole KS (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Arch. Sci. Physiol.* 3: 253-258.

Cordero-Morales JF, Cuello LG, Zhao Y, Jogini V, Cortes DM, Roux B, Perozo E (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(4): 311-318.

Cortini F (2004). Analisi strutturale del blocco da bario nel canale di potassio Kcv. Diplomarbeit: Universita degli Studi Milano.

Dascal N (1987). The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 317-387.

Daudin EM (1802). *Histoire Naturelle des Rainettes des Grenouilles et des Crapauds*. Ler-rault, Paris

D'Avanzo N, Cho HC, Tolokh I, Pekhletski R, Tolokh I, Gray C, Goldman S, Backx PH (2005). Conduction through the inward rectifier potassium channel, Kir2.1, is increased by negatively charged extracellular residues. *J. Gen. Physiol.* 125(5): 493-503.

Doyle DA, Morais CJ, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.

Ehrenstein G (2001). Surface charge. *Biophysics Textbook Online*. Rockville Pike, Biophysical Society, biophysics.org

Elinder F, Arhem P (1999). Role of individual surface charges of voltage-gated K channels. *Biophys. J.* 77(3): 1358-1362.

Ewart GD, Mills K, Cox GB, Gage PW (2002) Amiloride derivatives block ion channel activity and enhancement of virus-like particle budding caused by HIV-1 protein Vpu. *Eur Biophys J.* 31: 26-35.

- Frohns F, Käsmann A, Kramer D, Schafer B, Mehmel M, Kang M, Van Etten JL, Gazzarrini S, Moroni A, Thiel G** (2006). Potassium ion channels of *Chlorella* viruses cause rapid depolarization of host cells during infection. *J. Virol.* 80(5): 2437-2444.
- Gazzarrini S, Kang M, Van Etten JL, Tayefeh S, Kast SM, DiFrancesco D, Thiel G, Moroni A** (2004). Long-distance interactions within the potassium channel pore are revealed by molecular diversity of viral proteins. *JBC* 279: 28443-28449.
- Gazzarrini S, Severino M, Lombardi M, Morandi M, DiFrancesco D, Van Etten JL, Thiel G, Moroni A** (2003). The viral potassium channel Kcv: structural and functional features. *FEBS Lett.* 552: 12-16.
- Gazzarrini S, Van Etten JL, DiFrancesco D, Thiel G, Moroni A** (2002). Voltage-Dependence of Virus-encoded Miniature K⁺ Channel Kcv. *J. Membr. Biol.* 187: 15-25.
- Geisberg JV, Chen, J-L, Ricciardi RP** (1995). Subregions of the adenovirus E1A transactivation domain target multiple components of the TFIID complex. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6283-6290.
- Getzoff ED, Cabelli DE, Fisher CL, Parge HE, Viezzoli, Banci L, Hallewell RA.** (1992). Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* 358: 347-351.
- Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC** (1983). Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* 306: 287-290.
- Gilbert DL, Ehrenstein G** (1969). Effect of divalent cations on potassium conductance of squid axons: determination of surface charge. *Biophys. J.* 9: 447-463.
- Gilly WF, Armstrong CM** (1982). Slowing of sodium channel opening kinetics in squid axon by extracellular zinc. *J. Gen. Physiol.* 79: 935-964.
- Goldstein SA, Price LA, Rosenthal DN, Pausch MH** (1996) ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13256-13261.
- Gonzales ME, Carrasco L** (2003) Viroporins. *FEBS Lett.* 552: 28-34.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971). Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.

Hahin R, Campbell DT (1983). Simple shifts in the voltage dependence of sodium channel gating caused by divalent cations. *J. Gen. Physiol.* 82: 785-805.

Haug T, Sigg D, Ciani S, Toro L, Stefani E, Olcese R (2004). Regulation of K⁺ flow by a ring of negative charges in the outer pore of BKCa channels. Part I: Aspartate 292 modulates K⁺ conduction by external surface charge effect. *J. Gen. Physiol.* 124(2): 173-184.

Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* 66: 1061-1067.

Heginbotham L, Odessey E, Miller C (1997). Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K⁺ channel. *Biochemistry* 36: 85-100.

Hertel B, Tayefeh S, Mehmel M, Kast SM, Van Etten J, Moroni A, Thiel G (2006). Elongation of Outer Transmembrane Domain Alters Function of Miniature K⁺ Channel Kcv. *J. Membrane Biol.* 210: 21–29.

Hilken G, Jglauer F, Richter HJ (1997). Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* als Labortier: Biologie, Haltung, Zucht und experimentelle Nutzung. Enke, Stuttgart

Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes. 3. Aufl., Sinauer Associates Inc., Sunderland

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 424-448.

Honig B, Nicholls A (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* 268: 1144-1149.

Hurst RS, Latorre R, Toro L, Stefani E (1995). External barium block of Shaker potassium channels: evidence for two binding sites. *J. Gen. Physiol.* 106(6): 1069-1087.

Hurst RS, Toro L, Stefani E (1996). Molecular determinants of external barium block in Shaker potassium channels. *FEBS Lett.* 388(1): 59-65.

- Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S** (1988). Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335: 645–648.
- Jan LY, Jan YN** (1992). Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 537-555.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002a). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417: 515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R** (2002b). The open pore conformation of potassium channels *Nature* 417: 523-526.
- Jiang Y, MacKinnon R** (2000). The barium site in a potassium channel by x-ray crystallography. *J. Gen. Physiol.* 115(3): 269-272.
- Jiang B, Sun X, Cao K, Wang R** (2002). Endogenous K_v channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Mol. Cell. Biochem.* 238: 69-79.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM** (2000). *Principles of Neural Science*, Fourth Edition (New York: McGraw-Hill).
- Kang M, Graves M, Mehmehl M, Moroni A, Gazzarrini S, Thiel G, Gurnon JR, VanEtten JL.** (2004a). Genetic diversity in *chlorella* viruses flanking *kcv*, a gene that encodes a potassium ion channel protein. *Virology* 326: 150-159.
- Kang M, Moroni A, Gazzarrini S, DiFrancesco D, Thiel G, Severino M, VanEtten JL.** (2004b). Small potassium ion channel proteins encoded by *chlorella* viruses. *PNAS* 101: 5318-5324.
- Kast C, Canfield V, Levenson R, Gros P** (1995). Membrane topology of Pglycoprotein as determined by epitope insertion: Transmembrane organization of the N-terminal domain of *mdr3*. *Biochemistry* 34: 4402–4411.
- Ketchum KA, Joiner WJ, Sellers AJ, Kaczmarek LK, Goldstein SA** (1995). A new family of out-wardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* 376: 690-695.

- Konno T, Busch C, Von Kitzing E, Imoto K, Wang F, Nakai J, Mishina M, Numa S, Sakmann B** (1991). Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the acetylcholine receptor channel. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 244: 69–79.
- Kovalenko A, Hirata F** (1999a). Potential of Mean Force between Two Molecular Ions in a Polar Molecular Solvent: A Study by the Three-Dimensional Reference Interaction Site Model. *J. Phys. Chem. B.* 103(37): 7942-7957.
- Kovalenko A, Hirata F** (1999b). Self-consistent description of a metal–water interface by the Kohn–Sham density functional theory and the three-dimensional reference interaction site model. *J. Chem. Phys.* 110: 10095-10099.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY** (1992). Primary structure and function of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127-133.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahmann T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA** (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300: 1922-1926.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P** (1992). Subunits stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9: 861-871.
- Long SB, Campbell EB, MacKinnon R** (2005). Crystal Structure of a Shaker Family Kp Channel. *Science* 309: 897-903.
- MacKinnon R, Miller C** (1989). Functional modification of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by trimethyloxonium. *Biochemistry* 28: 8087–8092.
- MacKinnon R, Latorre R, and Miller C** (1989). Role of surface electrostatics in the operation of a high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Biochemistry* 28: 8092–8099.
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Kaufman A** (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-49.
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S** (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411: 657-661.
- MacKinnon R, Zhou M, Morais-Cabral JH** (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414: 37-42.

- Madeja M** (2000). Extracellular Surface Charges in Voltage-Gated Ion Channels. *News Physiol. Sci.* 15: 15-19.
- Marmont G** (1949). Studies on the axon membrane. *J. Cell. Comp. Physiol.* 34: 351-382.
- Mehmel M, Rothermel M, Meckel T, VanEtten JL, Moroni A, Thiel G** (2003). Possible function for virus encoded K⁺ channel Kcv in the replication of *chlorella* virus PBCV-1. *FEBS Lett.* 552: 7-11.
- Mertz JE, Gurdon JB** (1977). Purified DNAs are transcribed after microinjection into *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(4): 1502-1506.
- Miller AG, Aldrich RW** (1996). Conversion of a delayed rectifier K⁺ channel to a voltage-gated inward rectifier K⁺ channel by three amino acid substitutions. *Neuron* 16(4): 853-858.
- Molina A, Ortega-Saenz P, Lopez-Barneo J** (1998). Pore mutations alter closing and opening kinetics in Shaker K⁺ channels. *J. Physiol.* 509(Pt 2): 327-337.
- Morais-Cabral JA, Zhou Y, MacKinnon R** (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 414: 37-42.
- Neher E, Sakmann B** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nimigean CM, Chappie JS, Miller C** (2003). Electrostatic tuning of ion conductance in potassium channels. *Biochemistry* 42: 9263–9268.
- Pagliuca C** (2005). Doktorarbeit: Purification & Reconstitution of the Virus-encoded K⁺ Channel Kcv. *Universita'degli Studi Milano*.
- Papazian DM** (2004). BK Channels: The Spring between Sensor and Gate. *Neuron* 42(5): 699-701.
- Parsegian A** (1969). Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221, 844-846.
- Piller SC, Ewart GD, Premkumar A, Cox GB, Gage PW** (1996). Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 111-115.

- Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA** (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* 69(3): 517-528.
- Plugge B, Gazzarrini S, Nelson M, Cerana R, Van Etten JL, Derst C, DiFrancesco D, Moroni A, Thiel G** (2000). A potassium channel protein encoded by *chlorella* virus PBCV-1. *Science* 287: 1641-1644.
- Roller A, Natura G, Bihler H, Slayman CL, Eing C, Bertl A** (2005). In the yeast potassium channel, Tok1p, the external ring of aspartate residues modulates both gating and conductance. *Pflugers Arch.* 451(2): 362-370.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular cloning*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sharp K, Fine R, and Honig B** (1987). Computer simulations of the diffusion of a substrate to an active site of an enzyme. *Science* 236: 1460–1463.
- Shealy RT, Murphy AD, Ramarathnam R, Jakobsson E, Subramaniam S** (2003). Sequence-Function Analysis of the K1-Selective Family of Ion Channels Using a Comprehensive Alignment and the KcsA Channel Structure. *Biophys. J.* 84: 2929–2942.
- Shrivastava IH, Bahar I** (2006). Common Mechanism of Pore Opening Shared by Five Different Potassium Channels. *Biophys. J.* 90: 3929-3940.
- Sigel E, Minier F** (2005). The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol. Nutr.Food Res.* 49(3): 228-234.
- Sigworth FJ, Spalding BC** (1980). Chemical modification reduces the conductance of sodium channels in nerve. *Nature* 283: 293-295.
- Soreq H** (1985). The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected *Xenopus* oocytes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18(3): 199-238.
- Stühmer W** (1992). Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol.* 207: 319-39.
- Talukder G, Tamkun MM and Harrison NL** (1995). A role for the “pre-pore” region of voltage-dependent K1 channels in gating and zinc modulation. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:1033.

Van Etten JL, Graves MV, Müller DG, Boland W, Delaroque N (2002). Phycodnaviridae - large DNA algal viruses. Arch. Virol. 147: 1479-1516.

Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S (2000). The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell Physiol. Biochem. 10(1-2):1-12.

Yang J, Yu M, Jan YN and Jan LY (1997). Stabilization of ion selectivity filter by pore loop ion pairs in an inwardly rectifying potassium channel. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1568–1572.

Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. Nature 411: 657-661.

Zhou M, Morais-Cabral JH, Kaufmann A, MacKinnon R (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel \pm Fab complex at 2.0 Å resolution. Nature 414: 43-48.

Anhang

A Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BK	<i>Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels</i>
cRNA	<i>copy</i> RNA
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EAG	<i>Ether-à-Gogo Kanäle</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
li	instantaner Strom
I _{ss}	stationärer (engl. <i>steady-state</i>) Strom
I	Strom
I _t	<i>Tail</i> -Strom
KcsA	Kaliumkanal aus <i>Streptomyces lividans</i>
Kcv	Kaliumkanal aus <i>Chlorellavirus</i>
kDa	Kilodalton
Kir	Kaliumkanäle (<i>inward rectifier</i>)
KirBac1.1	Kaliumkanal aus <i>Burkholderia pseudomallei</i>
Kv	Kaliumkanäle (<i>voltage gated</i>)
LB	Luria Bertani-Medium
MthK	Kaliumkanal aus <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
n	Anzahl der Versuchswiederholungen
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorella</i> Virus 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	Enzym aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
Taq	Enzym aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TM	Transmembran (-region)
M	Transmembran (-region)
TM1	Erste Transmembrandomäne
U	Unit
mV	Millivolt
V	Spannung
wt	Wildtyp

B Aminosäuren, Ein- und Dreibuchstabencode

A	Ala	Alanin	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	X		unbestimmt
M	Met	Methionin			

C Umkehrspannungen

Zusammenstellung der Umkehrspannungen und Umkehrspannungs-Verschiebung für Kcv wt und die einzelnen Mutanten

	50K⁺	100K⁺	20K⁺	50Na⁺ shift	50Rb⁺ shift
Kcv	-18,34 ± 1,73 n=13	-2,38 ± 3,48 n=13	-49,65 ± 4,97 n=7	-58,95 ± 4,73 n=4	1,26 ± 1,06 n=6
K46A	-17,3 ± 1,66 n=4	-1,46 ± 1,11 n=3	-49,7 ± 10,5 n=3	-57,6 ± 10,6 n=2	
K47A	-19,16 ± 2,62 n=6	-0,86 ± 1,30 n=7	-62,6 ± 2,57 n=3	-45,07 ± 5,6 n=3	-3,06 ± 2,78 n=5
K46A/K47A	-21,35 ± 0,98 n=4				
K46R	-20,33 ± 2,38 n=8	-0,18 ± 4,8 n=7	-59,24 ± 6,14 n=5		4,3 n=1
K47R	-16,16 ± 1,64 n=3				3,2 n=1
D45N	-17,02 ± 3,01 n=9	0,36 ± 1,91 n=5	-52,77 ± 2,59 n=4		-2,65 ± 0,25 n=2
D45E	-16,72 ± 1,3 n=5	4,48 ± 4,37 n=5	-54,75 ± 6,09 n=4		
D68N	-9,9 ± 4,3 n=8	1,6 ± 1,4 n=3	-18,9 ± 3,6 n=2		

D Mutagenese primer

Kcv_D45A

forward: 5'__ggt gca aac ccg **gca** aaa aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt ttt **tgc** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45V

forward: 5'__ggt gca aac ccg **gtg** aaa aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt ttt **cac** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45E

forward: 5'__ggt gca aac ccg **gag** aaa aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt ttt **ctc** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45N

forward: 5'__ggt gca aac ccg **aac** aaa aag gca tca tgg __3'

reverse: 5'__cca tga tgc ctt ttt **gtt** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_K46A

forward: 5'__gca aac ccg gac **gca** aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt **tgc** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_K46R

forward: 5'__gca aac ccg gac **agg** aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt **cct** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_K46H

forward: 5'__gca aac ccg gac **cat** aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt **atg** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_K46E

forward: 5'__gca aac ccg gac **gaa** aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt **ttc** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K46D

forward: 5'__gca aac ccg gac **gac** aag gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc ctt **gtc** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K47A

forward: 5'__gca aac ccg gac aaa **gca** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **ttt** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K47R

forward: 5'__gca aac ccg gac aaa **aga** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **tct** ttt gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K47H

forward: 5'__gca aac ccg gac aaa **cac** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **gtg** ttt gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K47E

forward: 5'__gca aac ccg gac aaa **gag** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **ctc** ttt gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K47D

forward: 5'__gca aac ccg gac aaa **gac** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **gtc** ttt gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ K46A & K47A

forward: 5'__gca aac ccg gac **gca gca** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **tgc tgc** gtc cgg gtt tgc__3'

Kcv_ D45A & K46A & K47A

forward: 5'__gca aac ccg **gca gca gca** gca tca tgg ata gat tgt ata tac ttc gg__3'

reverse: 5'__cc gaa gta tat aca atc tat cca tga tgc **tgc tgc tgc** cgg gtt tgc__3'

Kcv_ D45N&K46A

forward: 5'__ gtt gca aac ccg **aac gca** aag gca tca tgg __3'

reverse: 5'__cca tga tgc ctt **tgc gtt** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45N&K46R

forward: 5'__gtt gca aac ccg **aac** aga **aag** gca tca tgg__3'

reverse: 5'__cca tga tgc **ctt** tct **gtt** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45N&K47A

forward: 5'__gtt gca aac ccg **aac** aaa **gca** gca tca tgg__3'

reverse: 5'__cca tga tgc **tg**c tt **gtt** cgg gtt tgc aac__3'

Kcv_D45N&K47R

forward: 5'__gtt gca aac ccg **aac** aaa **agg** gca tca tgg__3'

reverse: 5'__cca tga tgc cct ttt **gtt** cgg **gtt** tgc aac__3'

Kcv_D52K

forward: 5'__g gca tca tgg ata **aaa** tgt ata tac ttc gga gta acg__3'

reverse: 5'__cgt tac tcc gaa gta tat aca **ttt** tat cca tga tgc c__3'

Kcv_D52A

forward: 5'__g gca tca tgg ata **gct** tgt ata tac ttc gga gta acg__3'

reverse: 5'__cgt tac tcc gaa gta tat aca **agc** tat cca tga tgc c__3'

Kcv_D52E

forward: 5'__g gca tca tgg ata **gag** tgt ata tac ttc gga gta acg__3'

reverse: 5'__cgt tac tcc gaa gta tat aca **ctc** tat cca tga tgc c__3'

Kcv_D52S

forward: 5'__g gca tca tgg ata **agt** tgt ata tac ttc gga gta acg__3'

reverse: 5'__cgt tac tcc gaa gta tat aca **act** tat cca tga tgc c__3'

Kcv_D52N

forward: 5'__g gca tca tgg ata **aac** tgt ata tac ttc gga gta acg__3'

reverse: 5'__cgt tac tcc gaa gta tat aca **gtt** tat cca tga tgc c__3'

Kcv_D52R

forward: 5'__gca tca tgg ata **cgt** tgt ata tac ttc g__3'

reverse: 5'__c gaa gta tat aca **acg** tat cca tga tgc__3'

Kcv_D52H

forward: 5'__gca tca tgg ata **cat** tgt ata tac ttc g__3'
reverse: 5'__c gaa gta tat aca **atg** tat cca tga tgc__3'

Kcv_D68N

forward: 5'__c gga ttc gga **aac** ata ctg cca aag acg acc g__3'
reverse: 5'__c ggt cgt ctt tgg cag tat **gtt** tcc gaa tcc g__3'

Kcv_D68E

forward: 5'__c gga ttc gga **gaa** ata ctg cca aag acg acc g__3'
reverse: 5'__c ggt cgt ctt tgg cag tat **ttc** tcc gaa tcc g__3'

Kcv_D68L

forward: 5'__c gga ttc gga **ctc** ata ctg cca aag acg acc g__3'
reverse: 5'__c ggt cgt ctt tgg cag tat **gag** tcc gaa tcc g__3'

Kcv_D68T

forward: 5'__c gga ttc gga **acc** ata ctg cca aag acg acc g__3'
reverse: 5'__c ggt cgt ctt tgg cag tat **ggt** tcc gaa tcc g

Kcv_D68S

forward: 5'__c gga ttc gga **agc** ata ctg cca aag acg acc g__3'
reverse: 5'__c ggt cgt ctt tgg cag tat **gct** tcc gaa tcc g__3'

Kcv_E36A

forward: 5'__ccg gga ggg ttc **gca** aat aac ttc tct gtt gca aac c__3'
reverse: 5'__g gtt tgc aac aga gaa gtt att **tg**c gaa ccc tcc cgg__3'

Kcv_E36V

forward: 5'__cg gga ggg ttc **gtt** aat aac ttc tct gtt gca aac c__3'
reverse: 5'__g gtt tgc aac aga gaa gtt att **aac** gaa ccc tcc cg__3'

Kcv_K72A

forward: 5'__c gga gat ata ctg cca gtc acg acc ggc gca **gca** ctt tgt acg__3'
reverse: 5'__cgt aca aag **tg**c tgc gcc ggt cgt gac tgg cag tat atc tcc g__3'

Kcv_K72V

forward: 5'__c gga gat ata ctg cca gtc acg acc ggc gca **ggt** ctt tgt acg__3'

reverse: 5'__cgt aca aag **aac** tgc gcc ggt cgt gac tgg cag tat atc tcc g__3'

Primer für die Sequenzanalyse

pSGEM Sequenzierungsprimer:

5'__GTAATACGACTCACTATAGGG__3'

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Thiel am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt und unter dem Geschäftszeichen TH 558/8-1 sowie TH 558/8-2 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Henrik von Rosenberg, Darmstadt, den 01.09.2006

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	von Rosenberg Lipinsky
Vorname	H. Henrik
Geburtstag	18.11.1970
Geburtsort	Neheim-Hüsten
Familienstand	ledig

Schulausbildung

09/1983 – 06/1990	Gymnasium an der Viktoriaschule Darmstadt Abschluss: Abitur.
09/1981 – 06/1983	Förderstufe an der Friedrich-Ebert-Schule Darmstadt
09/1980 – 06/1981	Grundschule an der Wilhelm-Leuschner-Schule Darmstadt
08/1977 – 06/1980	Grundschule an der Deutschen Schule Mailand

Studium

07/2002 – 11/2006	Promotionsstudium am Botanischen Institut der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel Titel der Arbeit: „Funktionelle Rolle von Oberflächenladungen in der <i>Turret</i> -Domäne des viralen Miniatur-Kaliumkanals Kcv“ Abschluss: Promotion. Gesamtnote „Sehr gut“.
07/2001 – 04/2002	Diplomarbeit am Botanischen Institut der der Technischen Universität Darmstadt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thiel mit dem Thema: Calcium induzierte Exozytose an Stomata Protoplasten von <i>Vicia faba</i> Abschluss: Diplom, Gesamtnote „Sehr gut“.
10/1994 – 04/2002	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Thiel einerseits für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und andererseits für die Erschaffung eines angenehmen Arbeitsumfeldes, welches der Motivation und dem Wohlbefinden sehr zuträglich war.

Herrn PD. Adam Bertl herzlichst für die Übernahme des Koreferates.

Karl Schuller und der Binford-Bande für die schnelle Umsetzung und Beratung bei verschiedensten Projekten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein spezieller Dank gilt Karl für die regelmäßige Ausrichtung von Fußballturnieren und dem freundschaftlichen Plausch.

Stefan Kast für die gute und erfolgreiche Kooperation.

Barbara Reinhards, der guten Seele und darüber hinaus dem wandelnden Duden der AG, für die nötigen Korrekturen.

Allen Mitarbeitern und Ex-Mitarbeitern der AG Thiel für den herzlichen Umgang, der ständigen Hilfsbereitschaft, die fröhlichen Grillabende, das Feierabend-Bier und die anregenden Diskussionen.

Ausdrücklicher Dank geht an:

Gisela für die strenge Laborerziehung und der tatkräftigen Unterstützung bei scheinbar unlösbaren Problemen, den exzellenten Tauchbildern und der erheitern-den Kommunikation.

Annette für die Unterstützung bei methodischen Fragen und dem offenen Ohr wenn der Wissenschaftler-*Blues* überhand gewonnen hat. Außerdem für die gemeinsam verbrachten Stunden und für die anhaltende Freundschaft.

Ulrike für die unermüdliche Bereitschaft elektrophysiologische Fragen zu klären und die spannenden Doppelkopf-Runden mit Mechthild und Annette.

Tob für eine lange gemeinsame Zeit in unserem „Büro“, für die wissenschaftlichen und privaten Diskussionen und der Vertiefung meiner anfangs rudimentären Computer-Kenntnisse.

Brigitte, der Marathonkönigin, mit der ich zusammen den Sprung ins kalte electrophysiologische Wasser gewagt habe und mit der ich hoffentlich auch in Zukunft den ein oder anderen heißen Kaffee trinken werde. Ferner gebührt ihr der Dank für das motivierende Interesse in der sich hinziehenden Abschlussphase.

Mario für den immer währenden Gegenpol, die magentafarbenen Büroutensilien und der Erkenntnis, dass im Chaos durchaus System zu finden ist.

Jörg, mein zweiter Büroinsasse, für die Fußball-Reflexionen und der regelmäßigen Motivation zum Biertrinken.

Astrid für den nie Enden wollenden Segen an Süßigkeiten und dem detaillierten Wissen an Umschiffungsmöglichkeiten von Bürokratischen Untiefen.

Cinzia für das hervorragende Tiramisu und das perfekte Sprachenwirrwarr.

Cristian für die Möglichkeit mein Italienisch aufzufrischen.

Nasty und Kathrin für die Möglichkeit mein Wissen weiter zu geben und die nie versiegenden und unvorhersehbaren Fehlerquellen.

Sascha für die bunten Bilder und die Abhandlungen über die Stärke des Nutella-aufstrichs auf dem Frühstücksbrötchen.

Xenopus laevis dafür, das mir nie eine unter dem Messer weggestorben ist.

Allen Freunden/innen und meiner WG, die sich öfter mein Kauderwelsch anhören mussten und mich wahrscheinlich auf Grund dessen öfter mal vom forschen abgehalten haben.

Meiner Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre.